

**Charakterisierung des physiologischen Einflusses der Phosphorylierung von  
GENOMES UNCOUPLED 4 (GUN4) auf die Tetrapyrrolbiosynthese und  
Untersuchung der retrograden Kommunikation zwischen Plastiden und  
Zellkern**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Andreas Sven Richter (M.sc.)

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter:     1. Prof. Dr. Bernhard Grimm  
                  2. Prof. Dr. Christian Schmitz-Linneweber  
                  3. Prof. Dr. Sacha Baginsky

Tag der mündlichen Prüfung: 22.03.2017



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>3</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>9</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>13</b>
<b>Abstract</b>	<b>15</b>
<b>Publikationsliste</b>	<b>17</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>19</b>
<b>1.1 Ein Meilenstein der Evolution: die biochemische Nutzung von Sonnenlicht</b>	<b>19</b>
<b>1.2 Das Prinzip der Lichtabsorption durch Chromophore</b>	<b>21</b>
<b>1.3 Eigenschaften der Tetrapyrrole höherer Pflanzen</b>	<b>22</b>
<b>1.4 Die Tetrapyrrolbiosynthese höherer Pflanzen</b>	<b>25</b>
1.4.1 Die Synthese der 5-Aminolävulinsäure	27
1.4.2 Von ALA zum Protoporphyrin IX	28
1.4.3 Der Verzweigungspunkt der Tetrapyrrolsynthese: Ein ProtoIX-Pool. Zwei Wege.	29
1.4.4 Der Häm-Synthesezweig	29
1.4.5 Die Synthese von Chlorophyllid	30
1.4.6 Die Synthese von Chlorophyll a und b	32
<b>1.5 Die MgCh: ein Multiproteinkomplex</b>	<b>33</b>
1.5.1 Der molekulare Motor der MgCh: die I und D Untereinheiten	34
1.5.2 Die katalytisch aktive H Untereinheit der MgCh	35
<b>1.6 GENOMES UNCOUPLED 4 (GUN4): ein Stimulator der MgCh</b>	<b>37</b>
1.6.1 GUN4 bindet Porphyrine	38
<b>1.7 Regulation der Tetrapyrrolbiosynthese</b>	<b>41</b>
1.7.1 Über die Notwendigkeit zur Regulation des Intermediatflusses innerhalb der TBS	41
1.7.2 Regulation der Genexpression von an der TBS beteiligten Genprodukten	42
1.7.3 Post-translationale Kontrolle enzymatischer Schritte der Tetrapyrrolbiosynthese	43
1.7.4 Proteinphosphorylierung: eine neue Ebene der Regulation der Tetrapyrrolbiosynthese	50

<b>1.8</b>	<b><i>Hello nucleus? The plastids are calling: retrograde Kommunikation zwischen Plastiden und Zellkern</i></b>	<b>57</b>
1.8.1	<i>Operational signaling</i> – die plastidäre(n) Antworte(n) auf Stress	59
1.8.2	<i>Biogenic signaling</i> – alles hört auf die Plastiden!	62
<b>1.9</b>	<b>Die Synthese von Phenylpropanoiden und Flavonoiden</b>	<b>70</b>
1.9.1	Die Biosynthesewege	70
1.9.2	Transkriptionelle Regulation der Phenylpropanoid-/Flavonoidbiosynthese	72
<b>1.10</b>	<b>Zielstellung</b>	<b>75</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>77</b>
<b>2.1</b>	<b>Anzucht von Organismen</b>	<b>77</b>
<b>2.2</b>	<b>Probenentnahme</b>	<b>78</b>
<b>2.3</b>	<b>Analysierte Genotypen</b>	<b>78</b>
<b>2.4</b>	<b>Extraktion und Analyse von Intermediaten und Endprodukten der Tetrapyrrolbiosynthese</b>	<b>80</b>
2.4.1	Extraktion	80
2.4.2	HPLC-Analyse	81
2.4.3	Spektrophotometrische Bestimmung von Chlorophyllen und Carotinoiden	81
<b>2.5</b>	<b>Bestimmung von Anthocyangehalten</b>	<b>81</b>
<b>2.6</b>	<b>Behandlung von Pflanzen mit Chemikalien</b>	<b>82</b>
2.6.1	Fütterung von 5-Aminolävulinsäure	82
2.6.2	Acifluorfen-Behandlung	82
2.6.3	Norflurazon-Behandlung	82
2.6.4	Hemmung der Anthocyanbiosynthese	82
2.6.5	Fütterung von Anthocyanvorstufen	83
<b>2.7</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>83</b>
2.7.1	RNA- Techniken	83
2.7.2	DNA- Techniken	85
2.7.3	Erzeugte und verwendete Konstrukte	92
2.7.4	Methoden zur Transformation von Organismen	96
<b>2.8</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>98</b>
2.8.1	Proteinisolation aus Blattgewebe	98
2.8.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	98
2.8.3	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)	98
2.8.4	Silberfärbung	99
2.8.5	Detektion von Proteinen mittels Western-Blot	100
2.8.6	Erzeugung eines phosphorylierungsspezifischen <i>Arabidopsis</i> GUN4 Antikörpers	101



2.8.7	Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine aus Bakterien	101
2.8.8	Aufreinigung des fullGUN4 Antikörpers für eine Immunopräzipitation	104
2.8.9	Chloroplastenisolation	105
2.8.10	Größenfraktionierung von plastidären Proteinen und Proteinkomplexen	106
2.8.11	Massenspektrometrische Analyse von Proteinen	108
2.8.12	Bindungsstudien	108
2.8.13	Immunopräzipitation (IP) von GUN4 aus Pflanzenextrakten	110
2.8.14	GFP-Lokalisationsstudien	111
<b>2.9</b>	<b>Bestimmung von Enzymaktivitäten</b>	<b>111</b>
2.9.1	ALA-synthese	111
2.9.2	Mg-Chelatase Aktivität	112
2.9.3	MgP-Methyltransferase-Aktivität	113
2.9.4	Phosphorylierungsassay für GUN4 mit Extrakten von <i>Synechocystis</i> , <i>Chlamydomonas</i> und <i>Arabidopsis</i>	113
2.9.5	GUN4-Kinaseassay mit Fraktionen der Größenausschlusschromatographie und Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation	115
2.9.6	Kinaseassay mit rekombinanten Kinasen	115
<b>2.10</b>	<b>Computergestützte Analysen</b>	<b>116</b>
2.10.1	Ermittlung der Länge des GUN4 C-Terminus	116
2.10.2	Bildbearbeitung und grafische Auswertung	117
2.10.3	Datenbanken und Online-Ressourcen	117
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>119</b>
<b>3.1</b>	<b>Untersuchungen zur <i>in vitro</i> Phosphorylierung von GUN4</b>	<b>119</b>
3.1.1	Entwicklung eines Kinaseassay für rekombinante Proteine	119
3.1.2	GUN4 wird durch eine membranständige Kinase an Serin(264) phosphoryliert.	120
3.1.3	Untersuchung der Redox-Abhängigkeit der GUN Phosphorylierung	122
3.1.4	Analyse der GUN4-Phosphorylierung in Anwesenheit von Intermediaten der TBS	124
3.1.5	Hinweise auf eine lichtabhängige Dephosphorylierung von GUN4	125
3.1.6	GUK-Assay in Anwesenheit von Phosphatase-Inhibitoren	126
3.1.7	Untersuchung der GUK-Aktivität unter verschiedenen Lichtbedingungen	126
3.1.8	GUK-Aktivität in chlorotischen Mutanten	128
3.1.9	GUK-Aktivität in <i>gun4</i> und <i>gun5</i> Mutanten	129
3.1.10	Zusammenfassung zur <i>in vitro</i> Phosphorylierung von GUN4	131
<b>3.2</b>	<b>Komplementation einer <i>gun4 knockout</i> Mutante mit nicht-phosphorylierbarem GUN4(S264I)</b>	<b>133</b>

<b>3.3</b>	<b>Expression von GUN4(S264D) in der <i>gun4-2 knockout</i> Mutante (konstitutives Phosphomimikry)</b>	<b>139</b>
3.3.1	Genexpression und Proteingehalte der an der TBS beteiligten Enzyme in <i>gun4-2/GUN4-D</i> Linien	142
3.3.2	Vergleichende Analyse von <i>gun4-2</i> Komplementationslinien mit <i>gun4 knockdown</i> Mutanten	145
3.3.3	<i>In vivo</i> und <i>in vitro</i> Analyse der MgCh- und MgPMT-Aktivität in <i>gun4-2</i> Komplementationslinien	148
<b>3.4</b>	<b>Faltung und Porphyrinbindung rekombinanter GUN4-Proteine</b>	<b>151</b>
<b>3.5</b>	<b><i>In vitro</i> Bindungsstudien von CHLH und GUN4</b>	<b>155</b>
<b>3.6</b>	<b>Vergleichende Analysen von <i>gun4-2</i> Komplementationslinien</b>	<b>157</b>
3.6.1	Analyse der ALA-Synthesekapazität in <i>gun4-2</i> Komplementationslinien	157
3.6.2	Untersuchung der Porphyrin-Akkumulation im Tagesverlauf	158
3.6.3	Der Einfluss von Kältestress auf die Akkumulation von Anthocyanen in <i>gun4</i> und <i>gun5</i> Mutanten	160
3.6.4	Analyse des retrograden Signalweges in <i>gun4-2</i> Komplementationslinien	162
<b>3.7</b>	<b>Untersuchungen zur Stabilität von GUN4</b>	<b>165</b>
3.7.1	Fütterung von ALA	165
3.7.2	Untersuchung der GUN4-Stabilität in einer induzierbaren <i>CHL27</i> RNAi Linie	167
3.7.3	Zusammenhang zwischen GUN4-Stabilität und Phosphorylierung	168
<b>3.8</b>	<b>Versuch der Detektion von phosphoryliertem GUN4 in Pflanzenextrakten</b>	<b>173</b>
3.8.1	Extraktion von Pflanzenproteinen in Anwesenheit von Phosphataseinhibitoren	173
3.8.2	Versuch der Anreicherung von endogenem GUN4 nach einem Kinaseassay	175
3.8.3	Analyse der Detektionsgrenze des pGUN4 Antikörpers	176
<b>3.9</b>	<b>Einfluss des GUN4 C-Terminus auf die Stimulation der MgCh in Angiospermen</b>	<b>179</b>
3.9.1	Evolution der Phosphorylierungsstelle innerhalb einer C-terminalen Erweiterung in GUN4-Homologen von Angiospermen	180
3.9.2	Untersuchungen zur Phosphorylierbarkeit von <i>Synechocystis</i> , <i>Chlamydomonas</i> und <i>Arabidopsis</i> GUN4	184
3.9.3	<i>In vitro</i> MgCh-Assay mit <i>Synechocystis</i> , <i>Chlamydomonas</i> und <i>Arabidopsis</i> GUN4	185
3.9.4	Analyse chimärer <i>Synechocystis</i> und <i>Chlamydomonas</i> GUN4-Proteine	188
3.9.5	<i>In vitro</i> MgCh-Assay mit C-terminal verkürzten GUN4-Proteinen	191
3.9.6	Vorhersage einer Protein-Protein-Interaktionsfläche im C-Terminus des <i>Arabidopsis</i> GUN4	192
3.9.7	Zusammenfassung zum Einfluss des C-Terminus auf die Funktion von GUN4	193

<b>3.10 Versuch der Identifizierung der GUN4-Kinase (GUK)</b>	<b>195</b>
3.10.1 GUN4 wird nicht während der MgCh-Reaktion phosphoryliert	195
3.10.2 GUN4 wird nicht durch STN7/8, TAK1 oder CSK phosphoryliert	196
3.10.3 Isolation der GUK-Aktivität mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation	197
3.10.4 Isolation der GUK-Aktivität mittels Größenausschlusschromatografie	199
3.10.5 Übersicht zu den identifizierten GUK-Kandidaten	203
3.10.6 GFP-Lokalisierungsstudien der identifizierten Proteinkinasen	206
3.10.7 Untersuchung der <i>in vitro</i> Phosphorylierung von GUN4 durch die identifizierten PLASTID PROTEIN KINASES WITH UNKNOWN FUNCTION (PKU) und die plastidäre CASEIN KINASE II (CKII)	208
3.10.8 Isolation von Mutanten für die identifizierten PKUs	213
3.10.9 Kinaseassay mit Extrakten von <i>pku</i> und <i>abc1k</i> Mutanten	219
3.10.10 Zusammenfassung zur Identifizierung der GUK	220
<b>3.11 Untersuchung einer zusätzlichen GUN4-Modifikation</b>	<b>221</b>
3.11.1 Veränderung des GUN4-Bandenmusters unter variierenden Wachstumsbedingungen	221
3.11.2 Die zusätzliche GUN4-Modifikation wird in der Dunkelheit induziert und ist unabhängig von der GUN4-Phosphorylierung	224
3.11.3 <i>In vitro</i> Untersuchungen zur zusätzlichen GUN4-Modifikation	225
3.11.4 Anreicherung der GUN4-Spezies nach einem Kinaseassay	227
3.11.5 Auswertung der massenspektrometrischen (MS) Analyse der GUN4-Banden B und C.	229
3.11.6 GUN4 wird zusätzlich an einem konservierten Peptid modifiziert	231
3.11.7 Hinweis auf die modifizierte Aminosäure des hochkonservierten Peptides von AtGUN4	232
3.11.8 Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der zusätzlichen Modifikation und der Funktion von GUN4	235
<b>3.12 Untersuchungen zur retrograden Kommunikation in <i>gun</i> Mutanten</b>	<b>237</b>
3.12.1 <i>gun</i> Mutanten zeigten eine verminderte Akkumulation von Anthocyanen nach Norflurazon-Behandlung	237
3.12.2 Analyse der Anthocyanbiosynthese in <i>gun</i> und nicht- <i>gun</i> Mutanten	240
3.12.3 Untersuchung der Anthocyanbiosynthese in An- und Abwesenheit von Norflurazon	243
3.12.4 Untersuchung von Anthocyanbiosynthese Mutanten	245
3.12.5 Analyse des RS unter Hemmung der Anthocyanbiosynthese	248
3.12.6 Umkehrung des molekularen <i>gun</i> Phänotyps in <i>gun</i> Mutanten	252
3.12.7 Zusammenfassung zum retrograden Signal der <i>gun</i> Mutanten	255

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>257</b>
<b>4.1</b>	<b>Phosphorylierung von GUN4</b>	<b>257</b>
4.1.1	GUN4 wird verstärkt in der Dunkelheit durch eine membranständige Proteinkinase phosphoryliert	257
4.1.2	Die Phosphorylierung von GUN4 wird durch Porphyrine modifiziert	259
4.1.3	Porphyrinbindung, sub-plastidäre Lokalisation und Stabilität werden nicht durch die Phosphorylierung von GUN4 beeinflusst	263
4.1.4	Phosphorylierung von GUN4 reduziert die Stimulationseffizienz der MgCh	266
4.1.5	Regulation der MgCh durch die Phosphorylierung des GUN4 C-Terminus ist beschränkt auf die Angiospermen: ein Arbeitsmodell	270
<b>4.2</b>	<b>Die Identität der GUK bleibt zunächst im Verborgenen</b>	<b>275</b>
4.2.1	Exkurs: die Identifizierung der plastid protein kinase with unknown function (PKU)	276
<b>4.3</b>	<b>Eine zusätzliche post-translationale Modifikation beeinflusst die Eigenschaften und Funktion von GUN4</b>	<b>279</b>
4.3.1	Hinweise zur Art der zusätzlichen post-translationalen Modifikation	281
4.3.2	Zusammenhang zwischen zusätzlicher GUN4-Modifikation und Stimulation der MgCh	283
<b>4.4</b>	<b>Einfluss der Phenylpropanoidbiosynthese auf die GUN-vermittelte retrograde Kommunikation</b>	<b>289</b>
4.4.1	Gemeinsamkeiten und Unterschiede bekannter <i>gun</i> Mutanten	289
4.4.2	Zusammenhang zwischen Anthocyanakkumulation und De-repression der <i>PHANGs</i> in <i>gun</i> Mutanten	292
4.4.3	Die Phenylpropanoidbiosynthese: ein Regulator nukleärer Transkription?	295
4.4.4	Ist ein Intermediat der Phenylpropanoidbiosynthese ein Vermittler des retrograden Signals in <i>gun</i> Mutanten?	298
4.4.5	Ursprung, Vermittlung und Konsequenz der GUN-vermittelten retrograden Kommunikation: ein Arbeitsmodell	303
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>309</b>
	<b>Anhang I – Primer</b>	<b>331</b>
	<b>Anhang II – HPLC Methoden</b>	<b>335</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>341</b>
	<b>Selbständigkeitserklärung</b>	<b>343</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>4CL</b>	4-COUMARATE:COA LIGASE
<b>A.dest/ ddH<sub>2</sub>O</b>	Aqua dest / di-dest. Wasser
AAA+	ATPases ASSOCIATED WITH VARIOUS CELLULAR ACTIVITIES
ABC1K	ACTIVITY OF BC1 COMPLEX KINASE-LIKE KINASE
ABI4	ABA-INSENSITIVE 4
ABS	Anthocyanbiosynthese
ALA	5-Aminolävulinsäure
ALAD	ALA-DEHYDRATASE
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
<b>bHLH</b>	BASIC HELIX-LOOP-HELIX
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
β-Cyc	β-Cyclocitral
β-DM	β-Dodecylmaltosid
<b>C4H</b>	CINNAMIC ACID 4-HYDROXYLASE
CA1	CARBOANHYDRASE 1
CAO	CHLOROPHYLL(IDE) A OXYGENASE
CBR	CHL B REDUKTASE
cDNA	complementary DNA/ komplementäre DNA
CHI	CHALCON ISOMERASE
Chl a/b	Chlorophyll a bzw. b
CHL27	katalytische Komponente der oxdiativen Cyclase
CHLG	Chl-SYNTHASE
CHLH/D/I	MgCh Untereinheiten H, D, I
Chlide	Chlorophyllid
ChlorA	Chloramphenicol
CHS	CHALCON SYNTHASE
CKII/cpCKII	CASEIN KINASE 2
CLP	CASEINOLYTIC PROTEASE
CoA	Co-ENZYM A
CP12	CHLOROPLAST PROTEIN 12
CPO	COPROPORPHYRINOGEN III OXIDASE
CPP1	CHAPERONE-LIKE PROTEIN OF POR 1
cpRNP	CHLOROPLAST RNA BINDING PROTEIN
cpSRP	CHLOROPLAST SIGNAL RECOGNITION PARTICLE
Cr	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
CSK	CHLOROPLAST SENSOR KINASE
CTL	C-terminale Länge
<b>Da</b>	Dalton
DFR	DIHYDROFLAVONOL 4-REDUCTASE
DHA	Dihydroactinidiolide
DL	Dauerlicht
DMABA	Dimethylaminobenzaldehyd
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPOR	lichtunabhängige POR / DARK OPERATING POR
DTT	Dithiothreitol
DVR	PROTOCHLOROPHYLLIDE-DIVINYL-REDUKTASE
<b>E.coli</b>	<i>Escherichia coli</i>
EAA	Ethylacetoacetat
EBGs	EARLY BIOSYNTHESIS GENES

	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
	EGL1	ENHANCER OF GL1
	EMS	Ethylmethansulfonat
<b>f.c.</b>		<i>final concentration</i>
	F3H/F3'H	FLAVANONE 3-HYDROXYLASE
	FBPase	FRUCTOSE-BISPHOSPHATASE
	FC	FERROCHELATASE
	FLU	FLUORESCENT IN BLUE LIGHT
	FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
<b>GAPDH</b>		GLYCERALDEHYD-3-PHOSPHAT-DEHYDROGENASE
	GBP	GluTR-BINDEPROTEIN
	GFP	GREEN FLUORESCENT PROTEIN
	GGR	GERANYL-GERANYL-REDUKTASE
	GL3	GLABRA 3
	GLU	Glutamat
	GluRS	GLUTAMYL-tRNA-SYNTHASE
	GluTR	GLUTAMYL-tRNA-REDUKTASE
	GSA	Glutamat-1-Semialdehyd
	GSAT	GLUTAMAT-1-SEMIALDEHYD-AMINOTRANSFERASE
	GUK	GUN4-Kinase
	GUN/ <i>gun</i>	GENOMES UNCOUPLED/ <i>genomes uncoupled</i>
<b>HCAR</b>		HYDROXY-CHL A REDUKTASE
	HL	Hochlicht
	HMBS	HYDROXYMETHYLBILAN-SYNTHASE
	HO/HY1	HÄMOXYGENASE
<b>IPTG</b>		Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
<b>KAP</b>		Kinaseassaypuffer
	Kb	Kilo-Basen = 1000 Basenpaare (bp)
	K <sub>d</sub>	Bindungskonstante
	Km	Kanamycin
	KT	Kurztag
<b>LB</b>		<i>Lysogeny Broth</i>
	LBGs	<i>LATE BIOSYNTHESIS GENES</i>
	LCAA/YCF54	LOW CHLOROPHYLL ACCUMULATION/ HYPOTHETICAL OPEN READING FRAME 54
	LDOX	LEUCOANTHOCYANIDIN DIOXYGENASE
	LHC	Lichtsammelkomplexe/ LIGHT HARVESTING COMPLEX
	LIL3	LIGHT HARVESTING LIKE PROTEIN 3
	LL	Schwachlicht
	LT	Langtag
<b>MAPK6</b>		MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE 6
	MBW	MYB-bHLH-WD40
	MDCA	3,4-(Methylenedioxy) cinnamic acid
	MEcPP	Methylerythritolcyclophosphat
	MEP	Methylerythritolphosphat-Weges
	MgCh	Mg-Chelatase
	MgP	Mg-protoporphyrin IX
	MgPMME	Mg-protoporphyrin IX monomethylester
	MgPMT/CHLM	Mg-PROTOPORPHYRIN IX METHYLTRANSFERASE
	MYB	MYELOBLASTOSIS
<b>NF</b>		Norflurazon
	Ni-NTA	<i>Ni-nitrilotriacetic acid</i>
	NL	Normallicht
	NTRC	NADPH-dependent THIOREDOXIN REDUCTASE C
<b>OD</b>		optische Dichte
	OGE	organelläre Genexpression
	<i>Os</i>	<i>Oryza sativa</i>
<b>PAL</b>		PHENYLALANINE AMMONIA LYASEN
	PAP(S)	3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat

PAP1/2	PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT 1/2
PAPST1	ADENOSINE 3'-PHOSPHO 5'-PHOSPHOSULFATE TRANSPORTER 1
PBG	Porphobilinogen
PC	PLASTOCYANIN
Pchl <sub>id</sub>	Protochlorophyllid
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PET	photosynthetische Elektronentransportkette
PFG	PRODUCTION OF FLAVONOL GLYCOSIDES
PHANGs	PHOTOSYNTHESIS-ASSOCIATED NUCLEAR GENES
PIP	<i>Piperonylic acid</i> / Piperonylsäure
PKU	PLASTID PROTEIN KINASE WITH UNKNOWN FUNCTION
POR	PROTOCHLOROPHYLLID OXIDOREDUKTASE
PPase	Phosphatase
PPOX	PROTOPORPHYRINOGEN IX OXIDASE
PPR	PENTATRICOPEPTID REPEAT
PQ	Plastoquinon
PRANGs	PLASTID REDOX-ASSOCIATED GENES
Protogen	Protoporphyrinogen IX
ProtoIX	Protoporphyrin IX
pS	Phospho-Serin
PS/HY2	PHYTOCHROMOBILIN-SYNTHASE
PSI/II	Photosystem I/II
pT	Phospho-Threonin
PTM	PHD TYPE TRANSCRIPTION FACTOR WITH TRANSMEMBRANE DOMAINS
qPCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
R <sup>2</sup>	Korrelationskoeffizient
RBCS	RUBISCO SMALL SUBUNIT
RIBA	RIBOFLAVIN A
RNS	reaktive Stickstoffverbindung/ <i>reactive nitrogen species</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies/ <i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RS	retrograder Signalweg
RT	Raumtemperatur (21°C)
S.D.	<i>standard deviation</i> / Standardabweichung
SDG	<i>sucrose density gradient</i> / Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation
SDM	<i>site directed mutagenesis</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEC	<i>size exclusion chromatography</i> / Größenausschluss Chromatografie
SEM	<i>standard error of mean</i> / Standardfehler des Mittelwertes
SORGs	SINGLET OXYGEN-RESPONSIVE GENES
Spec	Spectinomycin
STN	STATE TRANSITION KINASE
Syn	<i>Synechocystis sp.</i>
	THYLAKOID ASSOCIATED KINASE 1
TAK1	
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	Tetrapyrrolbiosynthese
TCA	Trichlor Essigsäure
tds	<i>tannin-deficient seeds</i>
TF	Transkriptionsfaktor
TM	Trockenmasse
T <sub>melt</sub>	Schmelzpunkt
TPST	TYROSYLPROTEIN SULFOTRANSFERASE
TPT	TRIOSEPHOSPHAT TRANSLOKATOR
Trp	Tryptophan
TRX	THIOREDOXIN(e)
tt/TT	<i>transparent testa</i> / TRANSPARENT TESTA
TTG1	TRANSPARENT TESTA GLABRA 1

	UROD	UROPORPHYRINOGEN III DECARBOXYLASE
	UROS	UROPORPHYRINOGEN III SYNTHASE
<b>v/v</b>		<i>volume to volume</i>
	Vol	Volumen
<b>w/v</b>		<i>weight in volume</i>
	WT	Wildtyp
<b>YEB</b>		<i>Yeast Extract Broth</i>



## Zusammenfassung

Als essentielle Co-faktoren von Proteinen sind die Endprodukte der Tetrapyrrolbiosynthese (TBS) unter anderem an der Schwefel- und Stickstoffassimilation (Sirohäm), der von Photorezeptoren abhängigen Genexpression (Phytochromobilin), Elektronenübertragungsreaktionen (Häm) und der Photosynthese (Chlorophyll) beteiligt. Eingeleitet wird die TBS mit der Synthese von 5-Aminolävulinsäure (ALA), dem universellen Vorläufer aller Tetrapyrrole. Im Zuge einer Vielzahl enzymatischer Reaktionen wird ALA in Photosynthese betreibenden Organismen zur Synthese von Häm, aber vor allem auch den Chlorophyllen genutzt. Am Verzweigungspunkt der TBS inserieren metallspezifische Chelatasen Eisen- (Ferrochelatase) oder Magnesium-Ionen (Mg-Chelatase, MgCh) in ein Porphyrin. Dabei leitet die MgCh die Synthese von Chlorophyllen ein. Die aus drei Untereinheiten (H, D, I) zusammengesetzte MgCh wird durch das GENOMES UNCOUPLED 4 (GUN4) Protein stimuliert. In Pflanzen ist GUN4 essentiell für die Aktivierung der MgCh und die Synthese von Chlorophyllen. GUN4 bindet das Substrat und Produkt der MgCh und ist eine Komponente der retrograden Kommunikation zwischen Plastiden und nukleärer Genexpression.

Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass GUN4 aus *Arabidopsis thaliana* ausschließlich an der vorletzten Aminosäure (Serin an Position 264) des C-Terminus phosphoryliert wird. Unabhängig vom Redox-Zustand wird die GUN4-Phosphorylierung in der Dunkelheit induziert. Ferner wurde eine negative Korrelation zwischen GUN4-Kinaseaktivität und dem Gehalt von Mg-Porphyrinen beobachtet. Die Phosphorylierung von GUN4 hat keinen Einfluss auf die Porphyrinbindung, Stabilität oder den retrograden Signalweg. Vielmehr zeigte sich, dass die *in vitro* und *in vivo* MgCh-Aktivität durch phosphoryliertes GUN4 nicht mehr stimuliert werden kann. Ferner zeigte sich, dass de-phosphoryliertes GUN4 die lichtabhängige Aktivierung der MgCh im Übergang von der Nacht zum Tag bewirkt. Die Übertragung eines Phosphatrestes führt zur post-translationalen Inaktivierung von GUN4, ohne jedoch die Interaktion mit der H Untereinheit der MgCh zu beeinträchtigen. Zeitgleich zur signifikanten Verlängerung des GUN4-C-Terminus, hat sich im Laufe der Evolution die in den Angiospermen hochkonservierte Phosphorylierungsstelle entwickelt. Biochemische Analysen an GUN4-Homologen aus *Synechocystis*, *Chlamydomonas* und *Arabidopsis* zeigen, dass die GUN4 Phosphorylierung auf die Angiospermen beschränkt ist. Im Hinblick auf die Flüsse von Intermediaten zwischen der Häm- und Chlorophyllsynthese im Verlauf eines Tages und unter variierenden Wachstumsbedingungen, stellt die Phosphorylierung von GUN4 einen neuen Mechanismus zur Regulation der MgCh-Aktivität dar.

Mit dem Versuch die GUN4-Kinase aus Pflanzenextrakten zu isolieren, wurden fünf bisher nicht bekannte plastidäre PLASTID PROTEIN KINASE WITH UNKNOWN FUNCTION (PKU) identifiziert.

Obwohl für alle PKU eine Annotation als Proteinkinasen vorlag, zeigten bisher nur die rekombinanten PKU1 und PKU3 eine Kinaseaktivität gegenüber plastidären Proteinen.

Unabhängig von der Phosphorylierung erfährt das GUN4 zusätzliche Modifikationen. Während der Proteingelektrophorese führen diese Modifikationen zur Aufspaltung des GUN4 in drei immunoreaktive Banden unterschiedlichen Molekulargewichts. Weiterführende Analysen ergaben, dass wenigstens eine dieser GUN4-Spezies als Folge einer redox-regulierten enzymatischen Aktivität aus Chloroplastenextrakten entsteht. Die erfolgreiche Anreicherung einer dieser Spezies und anschließende massenspektrometrische Untersuchungen deuten auf eine Modifikation innerhalb eines konservierten Bereiches von GUN4. Dieser Bereich ist möglicherweise für die Interaktion von GUN4 mit der MgCh notwendig. Mit Hilfe von biochemischen und *in silico* Analysen konnten erste Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen zusätzlicher GUN4 Modifikation und der MgCh-Aktivität unter physiologisch relevanten Bedingungen abgeleitet werden.

Zusätzlich zur Aufklärung der post-translationalen Modifikationen von GUN4 wurden Experimente zum durch die GUN-Proteine vermittelten retrograden Signalweg durchgeführt. Es wurde beobachtet, dass *gun* Mutanten durch eine defizitäre cytosolische Flavonoidbiosynthese charakterisiert sind. Unter Bedingungen, die zur Hemmung der Plastidenentwicklung führen, wird die De-repression von *PHOTOSYNTHESIS-ASSOCIATED NUCLEAR GENES (PHANGS)* in *gun* Mutanten von einer reduzierten Anthocyanakkumulation begleitet. Wie sich herausstellte, wird diese durch eine Veränderung in der Transkription von Flavonoidbiosynthesegenen in den *gun* Mutanten bedingt. Auf der Suche nach Hinweisen für einen Zusammenhang zwischen Anthocyanen und der De-repression von *PHANGs* wurde eine neue *gun* Mutante identifiziert. Der *knockout* der durch *TRANSPARENT TESTA 4 (TT4)* kodierten *CHALCON SYNTHASE* führte zu einer mit den *gun1*, 4 und 5 Mutanten vergleichbaren De-repression der *PHANGs* nach Norflurazon (NF)-Behandlung. Fütterungsversuche mit Intermediaten der Phenylpropanoidbiosynthese und pharmakologische Einflussnahme lassen vermuten, dass ein Intermediat der cytosolischen Phenylpropanoidbiosynthese eine Komponente im retrograden Signalweg ist. Die Verhinderung der Akkumulation dieser Vorstufe (möglicherweise p-Coumarinsäure) in *gun4* und *gun5* Mutanten, führt zu einer WT-artigen Expression von *PHANGs* nach NF-Behandlung. Mit den durchgeführten Experimenten wurden erste Belege für eine Funktion der Phenylpropanoidbiosynthese in der durch die GUN-Proteine vermittelten retrograden Kommunikation gefunden.

## Abstract

End products of plant tetrapyrrole biosynthesis (TBS) are involved in the assimilation of sulfur and nitrogen (siroheme), photoreceptor mediated control of nuclear gene expression (phytochromobilin), electron transfer reactions (heme) and photosynthesis (chlorophyll). TBS is initiated with the synthesis of 5-aminolevulinic acid (ALA), the common precursor for all tetrapyrroles. Subsequently ALA is used to form heme and chlorophylls in photosynthetic active organisms. At the branch point of TBS the insertion of iron (Ferrochelatase) or magnesium-ion (Mg-chelatase, MgCh) into a porphyrin intermediate is catalyzed by metal specific chelatases. The MgCh initiates the synthesis of chlorophylls. MgCh consist of three subunits (H, D, I), and is stimulated by the interaction with the GENOMES UNCOUPLED 4 (GUN4) protein. In plants GUN4 is essential for activation of MgCh and ultimately for chlorophyll formation. GUN4 binds both, substrate and product of the MgCh, and was shown to be involved in the retrograde plastid-to-nucleus communication pathway.

With the presented results it is shown that *Arabidopsis* GUN4 is exclusively phosphorylated at serine 264 (S264), the penultimate amino acid residue at the C-terminus. While GUN4 is preferentially phosphorylated in darkness in a redox independent manner, phosphorylation is reduced upon accumulation of Mg porphyrins. Phosphorylation does not interfere with the porphyrin binding properties, stability or the GUN4-dependent retrograde signalling pathway. In contrast, phosphorylation of GUN4 prevents stimulation of both *in vitro* and *in vivo* MgCh activity. It was shown that de-phosphorylated GUN4 is essential to activate the MgCh during the transition from dark to light. The transfer of a phosphate group leads to the post-translational inactivation of GUN4 without disturbing the interaction with MgCh. Analysis of GUN4 found in oxygenic photosynthetic organisms reveals the evolution of a C-terminal extension which harbours the phosphorylation site of GUN4 expressed in angiosperms. Homologs of GUN4 from *Synechocystis* and *Chlamydomonas* lack the conserved phosphorylation site found in a C-terminal extension of angiosperm GUN4. Biochemical studies proved the importance of the C-terminal extension for MgCh stimulation and inactivation of GUN4 by phosphorylation in angiosperms. GUN4 phosphorylation is suggested to represent a new regulatory mechanism of MgCh activity during diurnal change of light and darkness and under varying growth conditions.

In an attempt to isolate the kinase responsible for GUN4 phosphorylation five formerly unknown PLASTID PROTEIN KINASE WITH UNKNOWN FUNCTION (PKU) were identified. Although all PKUs were annotated as protein kinases, up to date only recombinant PKU1 and PKU3 could be shown to have protein kinase activity for plastid proteins.

Independent of the phosphorylation GUN4 is further modified leading to three distinguishable GUN4 species with different molecular weight during protein gel electrophoresis. The formation of at least one of the GUN4 species depends on a redox-regulated enzyme activity located in plastid extracts. Enrichment and mass spectrometry of this protein species revealed a modification within a conserved part of GUN4 which is proposed to play a role in mediating the interaction with MgCh. Biochemical and *in silico* analysis identified an interdependency of this additional modification and stimulation of MgCh under physiologically relevant conditions.

In addition to the elucidation of the post-translational GUN4 modifications, experiments concerning the GUN-dependent retrograde signaling pathway were performed. Starting point was the observation that the cytosolic flavonoid biosynthesis is altered in *gun* mutants. Under conditions which lead to a block of chloroplast development the de-repression of *PHOTOSYNTHESIS-ASSOCIATED NUCLEAR GENES (PHANGs)* is paralleled by a reduced accumulation of anthocyanins in the *gun* mutants. The lack of anthocyanin biosynthesis can be attributed to altered expression of flavonoid biosynthetic genes. When searching for a correlation between anthocyanin biosynthesis and *PHANG* expression a new *gun* mutant was identified. The knockout of *CHALCONE SYNTHASE* encoded by *TRANSPARENT TESTA 4 (TT4)* leads to a comparable de-repression of *PHANGs* after norflurazon (NF) treatment as it was observed for the *gun1*, 4 and 5 mutants. Feeding experiments of phenylpropanoid biosynthesis intermediates and pharmacological modification revealed that an intermediate of the phenylpropanoid biosynthesis pathway is a component of chloroplast-to-nucleus communication. By preventing the accumulation of the intermediate (most likely p-coumaric acid) during NF treatment the de-repression of *PHANGs* can be rescued to WT-level in *gun4* und *gun5*. Hence, first evidences for a function of the phenylpropanoid biosynthesis pathway in mediating the GUN-dependent retrograde signal were obtained.

**Schlagworte:** Tetrapyrrolbiosynthese, Mg-Chelatase, GENOMES UNCOUPLED 4, Phosphorylierung, retrograde Kommunikation

## Publikationsliste

Publikationen, die im Rahmen der Arbeiten zur vorliegenden Schrift erzeugt und veröffentlicht wurden.

**Richter AS, Hochheuser C, Fufezan C, Heinze L, Kuhnert F and Grimm B (2016).** Phosphorylation of GENOMES UNCOUPLED 4 alters stimulation of Mg chelatase activity in angiosperms. *Plant Physiol.* DOI: 10.1104/pp.16.01036

**Richter AS, Gartmann H, Fechner M, Rödiger A, Baginsky S und Grimm B (2016).** Identification of four plastid-localized protein kinases. *FEBS Letters* 590: 1749-1756.

**Brzezowski P, Richter AS und Grimm B (2015).** Regulation and function of tetrapyrrole biosynthesis in plants and algae. *Biochim Biophys Acta* 1847: 968-985.

**Richter AS und Grimm B (2013).** Thiol-based redox control of enzymes involved in the tetrapyrrole biosynthesis pathway in plants. *Front Plant Sci* 4: 371.

Weitere Publikationen:

**Richter AS\*, Wang P\* und Grimm B (2016).** Arabidopsis Mg-Protoporphyrin IX Methyltransferase Activity and Redox Regulation Depend on Conserved Cysteines. *Plant Cell Physiol.* \*gleichberechtigte Erstautorenschaft

**Urbischek M, Nick von Braun S, Brylok T, Gugel IL, Richter AS, Koskela M, Grimm B, Mulo P, Bolter B, Soll J, Ankele E and Schwenkert S (2015).** The extreme Albino3 (Alb3) C terminus is required for Alb3 stability and function in Arabidopsis thaliana. *Planta* **242**: 733-746.

**Brzezowski P, Schlicke H, Richter AS, Dent RM, Niyogi KK and Grimm B (2014).** The GUN4 protein plays a regulatory role in tetrapyrrole biosynthesis and chloroplast-to-nucleus signalling in Chlamydomonas reinhardtii. *Plant J* **79**: 285-298.

**Schlicke H, Hartwig AS, Firtzlaff V, Richter AS, Glasser C, Maier K, Finkemeier I und Grimm B (2014).** Induced deactivation of genes encoding chlorophyll biosynthesis enzymes disentangles tetrapyrrole-mediated retrograde signaling. *Mol Plant* **7**: 1211-1227.

**Richter AS, Peter E, Rothbart M, Schlicke H, Toivola J, Rintamaki E und Grimm B (2013).** Posttranslational influence of NADPH-dependent thioredoxin reductase C on enzymes in tetrapyrrole synthesis. *Plant Physiol* **162**: 63-73.

**Kim S, Schlicke H, Van Ree K, Karvonen K, Subramaniam A, Richter AS, Grimm B und Braam J (2013).** Arabidopsis chlorophyll biosynthesis: an essential balance between the methylerythritol phosphate and tetrapyrrole pathways. *Plant Cell* **25**: 4984-4993.

**Hampp C\*, Richter AS\*, Osorio S, Zellnig G, Sinha AK, Jammer A, Fernie AR, Grimm B und Roitsch T (2012).** Establishment of a photoautotrophic cell suspension culture of Arabidopsis thaliana for photosynthetic, metabolic, and signaling studies. *Mol Plant* **5**: 524-527. \*gleichberechtigte Erstautorenschaft

**Czarnecki O, Hedtke B, Melzer M, Rothbart M, Richter AS, Schroter Y, Pfannschmidt T und Grimm B (2011).** An Arabidopsis GluTR binding protein mediates spatial separation of 5-aminolevulinic acid synthesis in chloroplasts. *Plant Cell* **23**: 4476-4491.

**Richter AS, Peter E, Pors Y, Lorenzen S, Grimm B and Czarnecki O (2010).** Rapid dark repression of 5-aminolevulinic acid synthesis in green barley leaves. *Plant Cell Physiol* **51**: 670-681.



# 1 Einleitung

## 1.1 Ein Meilenstein der Evolution: die biochemische Nutzung von Sonnenlicht

Mit Hilfe der Triebkraft der Evolution wurde bereits zu einem frühen Zeitpunkt in der Erdgeschichte (vor etwa 4-3,5 Milliarden Jahren, Hohmann-Marriott und Blankenship (2011)) eine Energiewende vollzogen, welche zu einer der größten Herausforderungen der Menschheit im 21. Jahrhundert zu werden scheint: die Nutzung der ubiquitär zur Verfügung stehenden Energie des Sonnenlichtes. Im Vergleich zur aktuellen Notwendigkeit der Nutzung dieser Energiequelle, welche vorrangig durch die Befriedigung der materiellen Ansprüche des Menschen an ein modernes Leben getrieben wird, waren die evolutionären Triebkräfte wohl von essentiellerer Natur. Erst die Entwicklung von molekularen Systemen zur Aufnahme und Nutzung der in Photonen konservierten Lichtenergie ermöglichte das Fortschreiten der Entwicklung von Lebensformen, wie sie auf der Erde anzutreffen waren und noch sind. Erst durch die Ausnutzung des Sonnenlichtes konnten die biochemischen Vorgänge und die sie beherbergenden Lebensformen komplexer werden. Immanenter Bestandteil dieser Mechanismen war und ist die Konservierung der Lichtenergie in Form von Energie- und Elektronendonatoren (wie zum Beispiel ATP und NADPH). Deren anschließende Oxidation liefert die Energie und Elektronen für biochemische Prozesse, wie etwa die CO<sub>2</sub>-Fixierung oder zum Aufbau reduzierter organischer Verbindungen.

Im Laufe der Erdgeschichte haben sich dabei zwei wesentliche Prinzipien zur Nutzung des Sonnenlichtes herausgebildet (Vermaas, 2001). Ein erster, im Verhältnis zum zweiten Prozess eher simpel erscheinender Mechanismus, basiert auf der Aktivität eines Rhodopsins, welches Retinal als Chromophor enthält. In Abhängigkeit der Verfügbarkeit von Licht einer bestimmten Qualität wird das Rhodopsin durch eine Konformationsänderung des Retinals befähigt, Protonen (Bakteriorhodopsin und Proteorhodopsin) und Chlorid-Ionen (Halorhodopsin) über eine Lipidmembran zu translozieren und somit einen elektrochemischen Gradienten aufzubauen (Heberle, 2000; Vermaas, 2001; Hohmann-Marriott und Blankenship, 2011). Dieser wird gemäß der chemiosmotischen Theorie von Mitchell (1961) durch geeignete Enzymkomplexe, wie zum Beispiel die protonentransportierende ATP-Synthase, zur Phosphorylierung von ADP und somit zur Synthese des ATPs genutzt.

Die Evolution des zweiten lichtgetriebenen Prozesses stellt zweifellos einen Meilenstein in der Evolution der Organismen dar. Dieser ermöglichte die Entwicklung von photoautotrophen Spezies, die ihren Energiebedarf (zeitweise) allein mit der Energie des Sonnenlichtes aufrechterhalten können. Während der lichtabhängigen Reaktionen der Photosynthese wird ebenfalls ein elektrochemischer Gradient für Protonen aufgebaut, der eine ATP-Synthase antreibt. Zusätzlich werden Elektronen von einem Donor auf einen speziesspezifischen Akzeptor übertragen. Die im

Laufe der Evolution genutzten Donatoren (organische Verbindungen, Sulfide, Wasserstoff oder Wasser) sind ebenso vielfältig wie die (finalen) Akzeptoren (zum Beispiel FeS-Cluster Proteine oder NADP<sup>+</sup>) (Hohmann-Marriott und Blankenship, 2011). Schlussendlich werden die Elektronen in metabolische Reaktionen wie beispielsweise den Calvin-Benson-Zyklus eingespeist und ermöglichen somit den Aufbau komplexer organischer Verbindungen aus anorganischem Kohlenstoff.

Die ersten bakteriellen Vertreter photosynthetisch aktiver Organismen waren durch die Entwicklung einer anoxygenen, nicht sauerstofffreisetzenden Form der Photosynthese charakterisiert. Diese sind die Vorläufer der zeitlich später entwickelten photosynthetischen Organismen, die die Anwesenheit von Sauerstoff tolerieren und Sauerstoff während der oxygenen Photosynthese freisetzen (Blankenship, 2010; Hohmann-Marriott und Blankenship, 2011). Die ersten photosynthetisch aktiven Organismen wurden in der Domäne der Bakterien gefunden (Heliobakterien, Acidobakterien, grüne Schwefelbakterien, Cyanobakterien, Purpurbakterien und filamentöse anoxygene Phototrope) und sind durch eine unterschiedliche Komplexität des photosynthetischen Apparates gekennzeichnet. Bedingt durch eine unabhängige Entwicklung der Vertreter dieser Phyla variiert die Art, Aufbau und Anzahl der Antennensysteme, der mobilen Elektronenakzeptoren, der Reaktionszentren, sowie weiterer Komponenten (Vermaas, 2001; Hohmann-Marriott und Blankenship, 2011; Nowicka und Kruk, 2016). Heutzutage wird davon ausgegangen, dass die sogenannte primäre Endosymbiose eines photosynthetisch aktiven Cyanobakteriums in einen nicht-photosynthetisch aktiven eukaryotischen Einzeller zunächst zur Evolution der Rot- und Grünalgen und anschließend zur Entwicklung der Pflanzen führte (Hohmann-Marriott und Blankenship, 2011).

Ungeachtet der Komplexität der entwickelten Mechanismen zur Nutzung des Sonnenlichtes haben diese eines gemein: Absorption von Photonen und die Umwandlung, sowie Weiterleitung der Energie durch einen oder mehrere Chromophore. Im Fall der photosynthetisch aktiven Organismen haben sich im Wesentlichen drei zu unterscheidende Gruppen an Chromophoren bzw. Pigmenten, die an den Reaktionen der Photosynthese beteiligt sind, herausgebildet: Phycobiline (unter anderem bei Cyanobakterien und Rotalgen), Carotinoide (unter anderem bei Archaea, Bakterien, Pflanzen), sowie die (Bakterio-)Chlorophylle (Chl) (unter anderem bei Cyanobakterien, Grünalgen und Pflanzen).

Die photosynthetischen Pigmente können nur in Kombination mit Proteinen und Proteinkomplexen ihre Aufgabe der Lichtabsorption und Energieweiterleitung erfüllen. Mit Ausnahme von Bakteriochlorophyllen, die auch in Chlorosomen der grünen Schwefelbakterien und filamentösen anoxygenen Prokaryoten eingeschlossen sein können, werden die Pigmente anderer photosynthetischer Organismen von Proteinen gebunden. Zum Teil assemblieren diese Proteine zu hochmolekularen Proteinkomplexen. Zu diesen zählen einerseits die Photosysteme I und II (PSI/II) der höheren Pflanzen, die die Reaktionszentren enthalten. Andererseits bilden auch die mit dem PSI/II



assoziierten Lichtsammelkomplexe (LHCs) Proteinkomplexe. Diese membranständigen Proteinkomplexe binden eine komplex- und speziesspezifische Anzahl von Chlorophyllen und Carotinoiden.

## 1.2 Das Prinzip der Lichtabsorption durch Chromophore

Im Allgemeinen sind Chromophore durch eine Vielzahl von aromatischen Ringen und/oder konjugierten Doppelbindungen (siehe folgender Abschnitt) und einem damit vorhandenen delokalisierten  $\pi$ -Elektronensystems charakterisiert (Angerhofer, 1991). Die freien Bindungselektronen, die nicht dauerhaft an einer Atombindung beteiligt sind, werden durch die Kollision mit einem Photon und der Aufnahme eines Teiles der Photonenenergie (Compton-Effekt) in einen energetisch höheren Singulett-Zustand ( $S_x$ ) überführt (*internal conversion* von zum Beispiel  $S_0$  nach  $S_1$ ). Man spricht dabei von der Anregung eines Moleküls. In Abhängigkeit des übertragenen Energiebetrages (Wellenlänge des Photons) werden von den Elektronen unterschiedliche Energieniveaus (S-Zustände) eingenommen. Aufgrund der Kurzlebigkeit der S-Zustände (Pico- bis Nanosekunden) relaxieren die Elektronen unter Abgabe der zuvor konservierten Energie in den Grundzustand. Fehlt es dem System an einem geeigneten Akzeptor, wird die Energie wieder in Form eines Photons emittiert (Fluoreszenz). Findet sich jedoch ein Akzeptor in räumlicher Nähe zu einem angeregten Molekül (wenige Nanometer), kann es zur strahlungsfreien Energieübertragung auf diesen Akzeptor kommen, wodurch er seinerseits angeregt wird (Förster-Resonanzenergietransfer). Dieser Prozess ist für die Übertragung von aufgenommener Energie innerhalb der Antennenkomplexe oder Reaktionszentren des Photosyntheseapparates essentiell. Auf diese Weise wird die durch Pigmente aufgenommene Energie aus den Antennenkomplexen zu den Reaktionszentren geleitet. In den Reaktionszentren der Photosysteme kann ferner ein angeregtes Elektron in Anwesenheit eines Oxidationsmittels aus dem Elektronenverbund eines angeregten Chlorophylls herausgelöst und auf einen Akzeptor übertragen werden (Phäophytin im Falle des PSII). Bei dem Prozess der Ladungstrennung am Chlorophyll-Molekül wird das vormals angeregte Molekül aufgrund des Verlustes eines Elektrons zum Oxidationsmittel und somit vom Elektronendonator zum Elektronenakzeptor. Bei der oxygenen Photosynthese mit zwei PS wird die Elektronenlücke am PSII durch die Oxidation von Wasser am *oxygen evolving complex* geschlossen. Die Chlorophylle des Reaktionszentrums im PSI werden durch die Elektronen aus dem Reaktionszentrum des PSII reduziert.

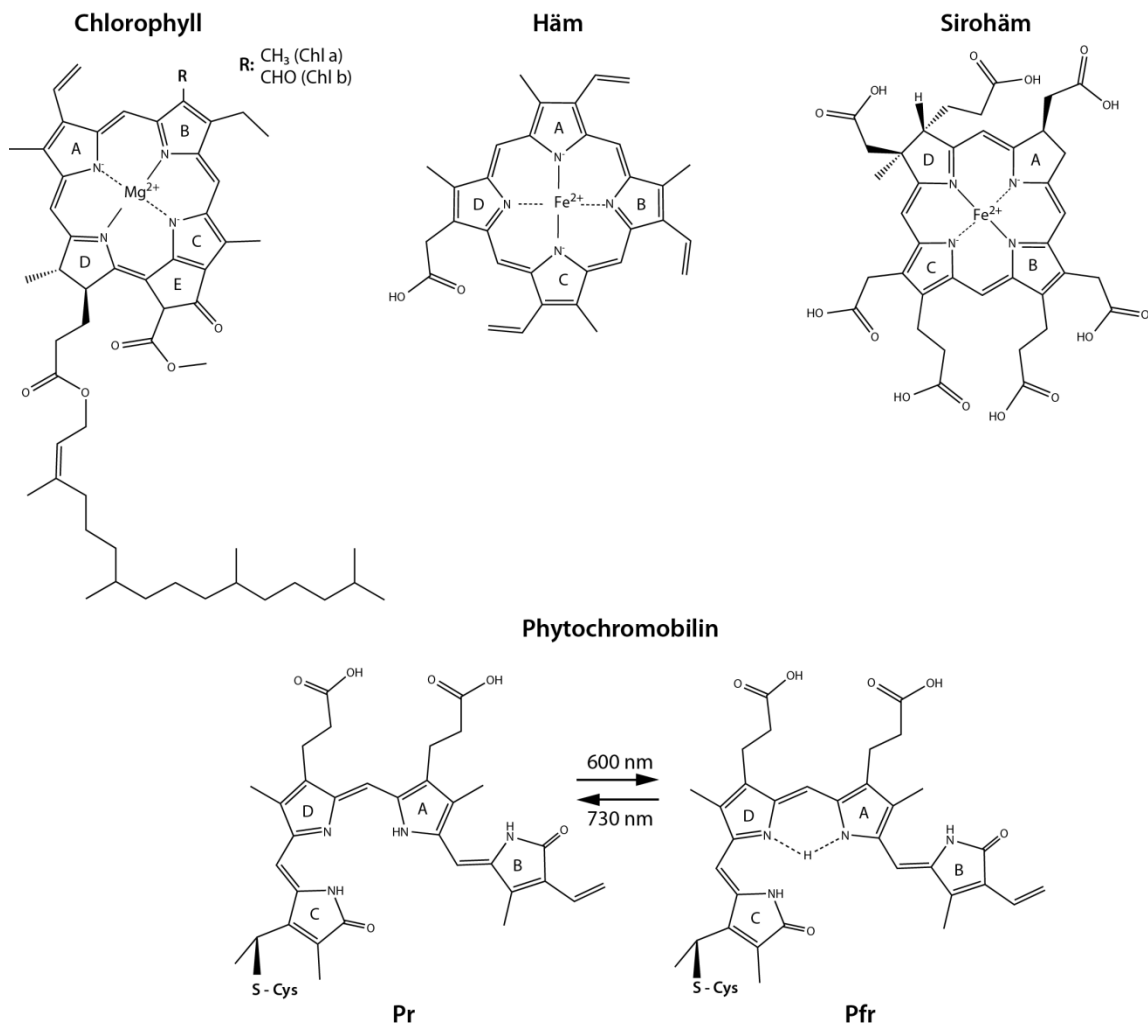
Wenngleich der folgende Prozess für die photosynthetische Nutzung der Energie eine eher untergeordnete Rolle spielt, sei aus Gründen der Vollständigkeit darauf hingewiesen, dass Elektronen aus einem (S-)Grundzustand auch in angeregte Triplet (T)-Zustände übergehen können. Da dieser

Vorgang (*intersystem crossing*) mit der Spinumkehr des Elektrons verbunden ist und solche Übergänge „spinverboten“ sind, sind diese unwahrscheinlich und durch eine längere Lebenszeit charakterisiert. Die Relaxation aus diesen T-Zuständen kann nur langsam erfolgen. Daher wird der freiwerdende Energiebetrag zumeist in Form von langlebiger Phosphoreszenz emittiert.

### **1.3 Eigenschaften der Tetrapyrrole höherer Pflanzen**

Nicht nur aufgrund ihrer Funktion innerhalb der Photosynthese, sondern auch durch ihre Beteiligung an stoffwechselphysiologischen Prozessen in nicht-photosynthetisch aktiven Organismen, wie zum Beispiel die Katalyse von Redox-Reaktionen oder innerhalb von Signaltransduktionswegen, hat die chemische Gruppe der Tetrapyrrole eine essentielle Bedeutung für jede Lebensform auf der Erde (Battersby, 1985; Avissar und Moberg, 1995).

In Ergänzung zum Chlorophyll werden mit Häm, Sirohäm und Phytychromobilin drei weitere Tetrapyrrole in höheren Pflanzen synthetisiert (Abbildung 1.1).



**Abbildung 1.1: Struktur der Tetrapyrrole.**

Die Strukturen wurden in Anlehnung an Tanaka und Tanaka (2007) mit der Software ChemDraw visualisiert.

Die unpolaren Chlorophylle tragen im Zentrum des Tetrapyrrolgerüsts ein von zwei Stickstoffatomen komplexiertes Magnesiumion. Die Anzahl der Kohlenstoffatome im Phytolrest und unterschiedliche Substituenten am Ring B bestimmen die photochemischen Eigenschaften dieser Chlorine (Abbildung 1.1). Im Unterschied zu den anderen Tetrapyrrolen weisen Chlorophylle einen zusätzlichen Ring E auf (Abbildung 1.1). Chlorophylle absorbieren Photonen aus dem blauen (400-500 nm) und roten (600-700 nm) Spektralbereich des Lichtes. Gemeinsam mit den akzessorischen Carotinoiden absorbieren Chlorophylle die photosynthetisch nutzbare Strahlung des Sonnenlichtes (*photosynthetic active radiation*- PAR) und machen diese für photochemische Prozesse zugänglich. In phototrophen Eukaryoten überwiegen Chlorophyll a und b quantitativ. In den Lichtsammelkomplexen (LHC) und den Reaktionszentren der Photosysteme dienen Chlorophylle der Absorption von Photonen, der Energieweiterleitung und der Ladungstrennung in der Photosynthese.

Häme gehören zur Gruppe der Eisenporphyrine. Im Zentrum aller Häme befindet sich ein Eisenatom ( $\text{Fe}^{2+}$ ), welches ebenfalls von zwei Stickstoffatomen des Porphyringerüsts chelatiert wird (Abbildung

1.1). In Abhängigkeit der Seitengruppen und der Oxidationsstufe des Zentralatoms gibt es unterschiedliche Häme, die auch in nicht photosynthetischen Organismen verschiedene Funktionen erfüllen. Gebunden an Enzyme sind sie z.B. in der mitochondrialen Atmungskette (dort u.a. als prosthetische Gruppen der Cytochrome) und im Photosyntheseapparat (u.a. im Cytochrom  $b_6$ -Komplex) zu finden. Häme können auch in die Katalyse von Redox-Reaktionen involviert sein.

Phytochromobilin, ein Produkt des Häm-Katabolismus, ist der lineare Chromophor des Phytochroms, welcher über ein Cystein kovalent an das Photorezeptor-Protein gebunden ist. Phytochromobilin nimmt in rotem und dunkelrotem Licht zwei unterschiedliche Konformationen ein (Abbildung 1.1). Durch die Absorption von hellrotem Licht (660 nm) wird die inaktive Konformation (Pr) in die aktive Form (Pfr) überführt. Die Absorption von Photonen aus dem dunkelroten Spektralbereich (730 nm) kehrt die Konformation um. Mit dieser Konformationsänderung des Phytochromobilins geht eine Änderung der Konformation des Holoproteins einher. Im aktivierten Zustand kann Phytochrom im Zellkern die Aktivität von Transkriptionsfaktoren über eine Kinase-Domäne steuern (Rockwell et al., 2006). Zu den durch Phytochrom regulierten Prozessen gehören beispielsweise die Keimung und Photomorphogenese (Chory et al., 1989). Auch einzelne Gene der Tetrapyrrolbiosynthese werden phytochromabhängig exprimiert (Mc Cormac et al., 2001).

Die Struktur des Sirohäm ähnelt der des Häms, unterscheidet sich jedoch in Art und Anzahl der Seitengruppen (Abbildung 1.1). Das zentrale Eisenion wird auch beim Sirohäm von zwei Stickstoffatomen gebunden. In der Tetrapyrrolbiosynthese geht Sirohäm aus der Methylierung von Uroporphyrinogen III hervor (Abbildung 1.2). Als prosthetische Gruppe von Nitrit- und Sulfitreduktasen ist Sirohäm an der Assimilation von Stickstoff- und Schwefelverbindungen beteiligt (Murphy et al., 1974).

## 1.4 Die Tetrapyrrolbiosynthese höherer Pflanzen

Im Zuge der Entwicklung der Organismen und den damit implizierten Evolutionsschritten haben sich in Abhängigkeit von Umweltfaktoren, Substratangeboten und Lebensweisen leicht unterschiedliche Synthesewege für Tetrapyrrole ausgebildet. In Hefen, Tieren, Pilzen und  $\alpha$ -Proteobakterien wird das Vorläufermolekül für alle Tetrapyrrole, die 5-Aminolävulinsäure (ALA), über den Shemin-Weg synthetisiert (Gibson et al., 1958; Kikuchi et al., 1958; Avissar et al., 1989). Im Shemin-Weg wird ALA aus Succinyl-CoA und Glycin gebildet. Viele Bakterien, Cyanobakterien und höhere Pflanzen nutzen hingegen den sogenannten C<sub>5</sub>-Weg zur Synthese von ALA (Beale und Castelfranco, 1973). Dieser basiert auf der Nutzung von Glutamat, welches an eine tRNA<sup>GLU</sup> geknüpft ist. Eine Ausnahme bildet *Euglena gracilis*. In *Euglena* wird ALA für plastidäre Tetrapyrrole über den C<sub>5</sub>-Weg (Dzelzkalns et al., 1982) und ALA für nicht-plastidäre Tetrapyrrole über den Shemin-Weg (Mayer et al., 1987) synthetisiert.

Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der Regulation der Tetrapyrrolbiosynthese (TBS) in *Arabidopsis thaliana* lag, beziehen sich die folgenden Ausführungen zur TBS auf multizelluläre aerobe photosynthetisch aktive Organismen, die ALA über den C<sub>5</sub>-Biosyntheseweg synthetisieren.

Im Wesentlichen lässt sich die plastidäre TBS wie folgt gliedern: an die initiale Synthese des universellen Vorläufers ALA schließt sich die Umsetzung von ALA zu Protoporphyrin IX (ProtoIX) an. Mit den folgenden Enzymschritten werden Häm (Eisenzweig) bzw. Chlorophyll (Magnesiumzweig) gebildet (Abbildung 1.2) (Tanaka und Tanaka, 2007; Tanaka et al., 2011).



**Abbildung 1.2:** Übersicht über die Intermediate, Endprodukte (fett) und enzymatischen Schritte (rot) des Tetrapyrrolstoffwechsels höherer Pflanzen.  
Weitere Erläuterungen im Text.

### 1.4.1 Die Synthese der 5-Aminolävulinsäure

Mit dem ersten Schritt des C<sub>5</sub>-Syntheseweges verknüpft die stromalokalisierte GLUTAMYL-tRNA-SYNTHASE (GluRS) unter ATP-Verbrauch Glutamat mit der dazugehörigen Träger-tRNA (Kannangara et al., 1994). Eine anschließende Reduktion der Glutamyl-tRNA (tRNA<sup>GLU</sup>) führt zur Bildung von Glutamat-1-Semialdehyd (GSA), einem instabilen Zwischenprodukt (Pontoppidan und Kannangara, 1994b). Diese Reaktion wird durch die GLUTAMYL-tRNA-REDUKTASE (GluTR), dem Schlüsselenzym der TBS, katalysiert. Die GluTR nutzt NADPH zur Reduktion der  $\alpha$ -Carboxylgruppe von Glutamat zum Aldehyd. *In vitro* liegt die GluTR von *Methanopyrus kandleri* als homodimerer Komplex aus zwei 54 kDa großen GluTR-Untereinheiten vor (Moser et al, 2001).

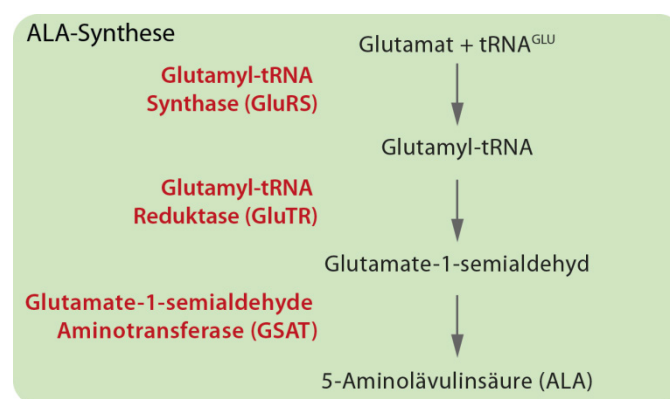


Abbildung 1.3: Die Synthese von 5-Aminolävulinsäure (ALA)

In Angiospermen sind drei Gene für GluTR-Isoformen (*HEMA1*, *HEMA2* und *HEMA3*) bekannt (Bougri und Grimm, 1996; Kumar et al., 1996; Tanaka et al., 1996). Die kodierende Sequenz von *HEMA1* und 2 sind zu 83% identisch, *HEMA3* hingegen zu den anderen beiden Genen nur zu 67%. Die in *HEMA1* codierte GluTR wird in allen Pflanzenteilen transkribiert (Ilag et al., 1994). *HEMA2* wird hauptsächlich in Wurzeln und Blüten exprimiert (Ujwal et al., 2002). Aufgrund einer sehr geringen Expression und des Fehlens von experimentellen Hinweisen auf eine physiologische Funktion von *HEMA3* wird dieses als Pseudogen eingestuft (Apitz et al., 2014). Die Expression der *HEMA*-Gene ist in der ersten Hälfte des Tages am höchsten und sinkt zur Nacht hin ab (Kruse et al., 1997).

Das GSA wird durch die GLUTAMAT-1-SEMIALDEHYD-AMINOTRANSFERASE (GSAT, Gough und Kannangara (1978); Grimm et al. (1989)) sofort zum ersten stabilen Intermediat, der ALA, umgesetzt (Abbildung 1.3).

### 1.4.2 Von ALA zum Protoporphyrin IX

Aus zwei Molekülen ALA wird das Pyrrol Porphobilinogen (PBG) gebildet (Abbildung 1.4). Unter Abspaltung von Wasser verbindet die ALA-DEHYDRATASE (ALAD) die ALA-Moleküle und setzt PBG frei. Die HYDROXYMETHYLBILAN-SYNTASE (HMBS) verknüpft 4 Moleküle PBG zum ersten linearen Tetrapyrrol dieses Biosyntheseweges, dem Hydroxymethylbilan (HMB). Das HMB wird durch die UROPORPHYRINOGEN III SYNTHASE (UROS) zum makrozyklischen Uroporphyrinogen III (UroIII) zirkularisiert (Hart und Battersby, 1985).

In einem Nebenzweig der TBS wird durch die Methylierung, Oxidation und die Insertion von  $\text{Fe}^{2+}$  in UroIII Sirohäm gebildet (Leustek et al., 1997; Raux-Deery et al., 2005) (Abbildung 1.4).

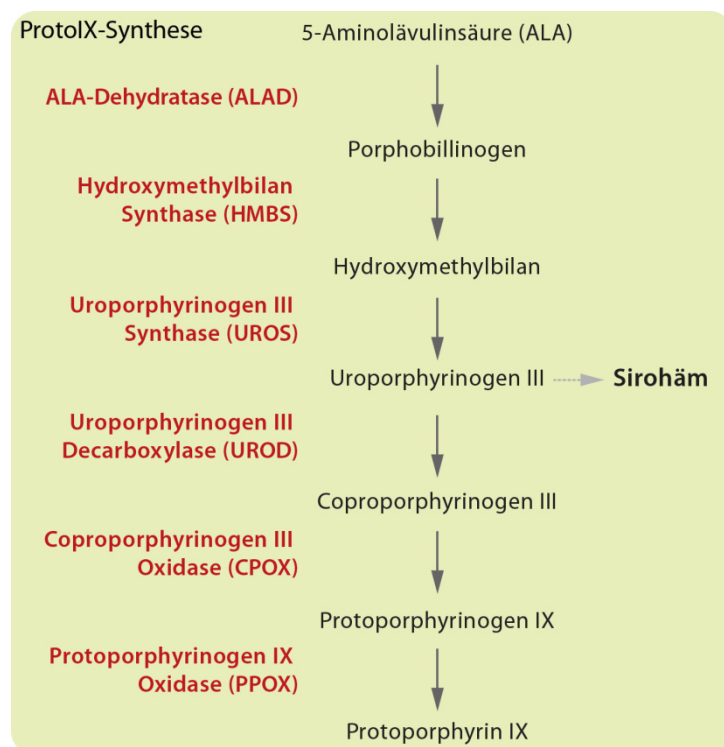


Abbildung 1.4: Die Synthese von Protoporphyrin IX.

UroIII wird anschließend zum Coproporphyrinogen III (CoprogenIII) decarboxyliert (UROPORPHYRINOGEN III DECARBOXYLASE, UROD, Chen und Miller (1974)). Die COPROPORPHYRINOGEN III OXIDASE (CPO) oxidiert CoprogenIII zum Protoporphyrinogen IX (Protogen). Eine FAD-haltige (Siepker et al., 1987) PROTOPORPHYRINOGEN IX OXIDASE (PPOX) oxidiert Protogen zum Protoporphyrin IX (ProtoIX, Abbildung 1.4). Bisher wurde davon ausgegangen, dass bei dieser Reaktion 6 Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen werden (Koch et al., 2004). Neuere Analysen der PPOX-Reaktion deuten jedoch auf eine Komponente der Photosynthese als Elektronenakzeptor hin (P. Brzezowski, CNRS, Frankreich, persönliche Kommunikation).



Interessanterweise wurde ein Zusammenhang zwischen PPOX-Reaktion und der Edierung von plastidären Primärtranskripten festgestellt (Zhang et al., 2014). Das letzte, für Chlorophyll- und Hämsynthese gemeinsame Enzym, die PPOX, wurde sowohl in den Plastiden, als auch in den Mitochondrien gefunden (Jacobs und Jacobs, 1987). Dies führte zu der Annahme, dass Protopogen in die Mitochondrien exportiert wird, um dort der mitochondrialen Hämsynthese zugeführt zu werden. Plastidäre und mitochondriale PPOX sind Enzyme annähernd gleicher Größe (Jacobs und Jacobs, 1987), die in Tabak durch zwei verschiedene Genen kodiert sind (Lermontova et al., 1997).

### 1.4.3 Der Verzweigungspunkt der Tetrapyrrolsynthese: Ein ProtoIX-Pool. Zwei Wege.

Am Verzweigungspunkt der TBS ist ProtoIX das letzte gemeinsame Intermediat für die Synthese von Häm und Chlorophyll (Abbildung 1.2).

ProtoIX ist sowohl das Substrat für den Eisen-, als auch für den Magnesiumzweig (Mg-Zweig) der TBS. Dabei haben die Mg-Chelatase (MgCh) und FERROCHELATASE (FC) eine unterschiedliche Affinität gegenüber dem Substrat. Die FC bindet ProtoIX mit einer wesentlich geringeren Affinität, als die MgCh. Der  $K_m$ -Wert der FC gegenüber ProtoIX ist 200-fach höher als der der MgCh (Walker und Willows, 1997). Folglich kann mehr ProtoIX in den Mg-Zweig geleitet werden. Passend dazu ist der Hämgehalt in grünem Gewebe 50-fach geringer als der Chlorophyllgehalt (Papenbrock et al., 1999). Zusätzlich zeigten sich für die beiden Chelatasen unterschiedliche Aktivitäts- und Expressionsmaxima im Tagesverlauf (Papenbrock et al., 1999). Zum Beginn des Tages zeigt die MgCh ihr Expressions- und Aktivitätsmaximum. Die FC hingegen wird zum Beginn der Nacht am stärksten exprimiert (Harmer et al., 2000).

### 1.4.4 Der Häm-Synthesezweig

Die Synthese des Häms wird durch die FC katalysiert. Diese enthält ein Eisen-Schwefel-Cluster und vollzieht die energieunabhängige Insertion von Eisen(II) in ProtoIX (Ferreira et al., 1995) (Abbildung 1.5).

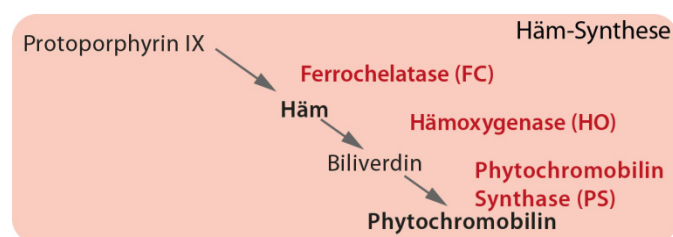


Abbildung 1.5: Die Häm-Synthese.

In Gerste und Arabidopsis wurde die Existenz von zwei Proteinen für die FC nachgewiesen (Little und Jones, 1976; Chow et al., 1998). Die Isoformen werden durch zwei verschiedene Gene kodiert und sind mit unterschiedlichen Transitsequenzen versehen, was zu der Annahme führte, dass sie in unterschiedliche Organellen importiert werden. Importexperimente zeigten, dass die FC1 sowohl in die Chloroplasten als auch Mitochondrien importiert wird, während sich die FC2 ausschließlich in den Chloroplasten befinden soll (Chow et al., 1998). *FC1* und *FC2* zeigen eine unterschiedliche Expression im Verlauf der Entwicklung von Arabidopsis und in variierenden Anzuchtsbedingungen. Während die *FC1* die stärkste Expression in nicht-photosynthetisch aktiven Geweben und unter biotischen und abiotischen Stressbedingungen aufweist, wird die *FC2* in allen Geweben gleichermaßen exprimiert (Chow et al., 1998; Singh et al., 2002; Scharfenberg et al., 2015).

Das offenkettige Biliverdin wird durch die Oxidation des makrozyklischen Häms mittels HÄMOXYGENASE (HO) gebildet (Emborg et al., 2006), welches anschließend durch die PHYTOCHROMOBILIN-SYNTHASE (PS) zu Phytochromobilin reduziert wird (Frankenberg et al., 2001) (Abbildung 1.5).

#### **1.4.5 Die Synthese von Chlorophyllid**

Mit der ersten enzymatischen Reaktion des Mg-Zweiges wird ein  $Mg^{2+}$  in das Tetrapyrrolgerüst von ProtoIX inseriert (Abbildung 1.6). Diese ATP-abhängige Reaktion (Hambricht, 1975) wird durch die MgCh katalysiert, welche sich aus 3 Untereinheiten zusammensetzt (*CHLD*, *CHLH*, *CHLI*, Bollivar et al. (1994a); Bollivar et al. (1994b); Jensen et al. (1996b)). In *Arabidopsis* existieren zwei *CHLI*-Isoformen (*CHLI-1* und *2*). Die durch *CHLI-1* kodierte Variante ist die für die Akkumulation von Chl wichtigere Isoform, deren Verlust in *Arabidopsis*, nicht aber in *Chlamydomonas* (Brzezowski et al., 2016), teilweise durch *CHLI-2* kompensiert werden kann (Huang und Li, 2009). Mutanten von Gerste mit Defekten in den einzelnen Untereinheiten zeigen eine verminderte MgCh-Aktivität und akkumulieren ProtoIX (Jensen et al., 1996a). Weitere Informationen zur Reaktion der MgCh werden im Abschnitt 1.5 (S.33) gegeben.

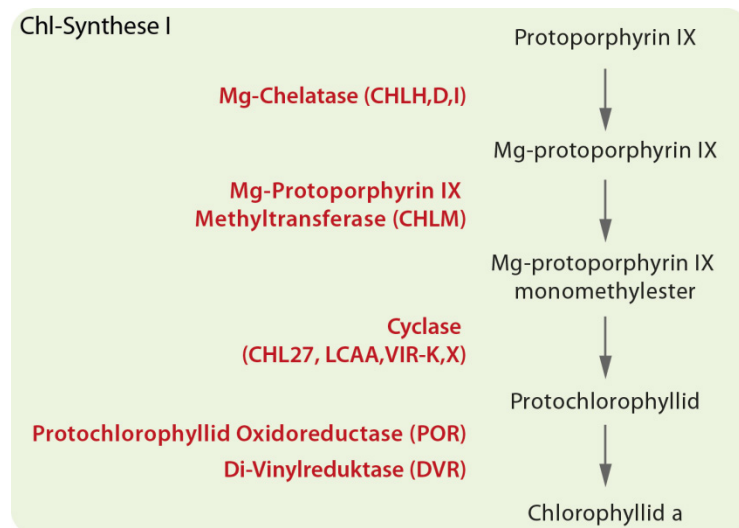


Abbildung 1.6: Von Protoporphyrin IX zum Chlorophyllid.

Das Produkt der MgCh-Reaktion, Mg-Protoporphyrin IX (MgP), wird durch die Mg-PROTOPORPHYRIN IX METHYLTRANSFERASE (MgPMT/CHLM, Shepherd et al. (2003)) zum Mg-Protoporphyrin IX Monomethylester (MgPMME) verestert (Abbildung 1.2). Anschließend wird dieses durch die (aerobe) CYCLASE zum Divinyl-Protochlorophyllid (DV-Pchlde) oxygeniert (Bollivar und Beale, 1996) (Abbildung 1.6). Die Cyclase besteht dabei aus einer löslichen und zwei membrangebundenen Untereinheiten, von denen bereits zwei charakterisiert wurden (CHL27, Tottey et al. (2003); Rzeznicka et al. (2005) und LCAA/YCF54, Albus et al. (2012); Hollingshead et al. (2012); Bollivar et al. (2014)). Die PROTOCHLOROPHYLLID-DIVINYL-REDUKTASE (DVR) reduziert DV-Pchlde zum Monovinyl-Pchlde. In Angiospermen wird Pchlde ausschließlich in einer lichtabhängigen Reaktion durch die PROTOCHLOROPHYLLID OXIDOREDUKTASE (POR) zum Chlorophyllid a (Chlide a) umgewandelt (Masuda und Takamiya, 2004) (Abbildung 1.6). In Gymnospermen, Algen und Cyanobakterien hingegen kann Pchlde auch durch eine lichtunabhängige POR (DPOR) zum Chlide umgewandelt werden. Daher können Vertreter dieser Gruppen Chl auch in der Abwesenheit von Licht synthetisieren (Reinbothe et al., 2010).

In *A. thaliana* sind drei verschiedene POR-Isoformen bekannt: PORA, PORB und PORC (Reinbothe et al., 1996; Su et al., 2001). Während die mRNA und PORA selbst nur in etiolierten Keimlingen detektierbar ist, findet sich PORB sowohl in Etioplasten, Etiochloroplasten als auch in Chloroplasten (Holtorf et al., 1995). PORA soll im Licht durch eine PORA spezifischen Protease abgebaut werden (Reinbothe et al., 1995a). Licht hat ebenfalls einen negativen Einfluss auf die Transkription und Stabilität der *PORA* mRNA (Benli et al., 1991; Reinbothe et al., 1995b; Holtorf und Apel, 1996; Lebedev und Timko, 1998). Die Expression von *PORB* unterliegt einer diurnalen und zirkadianen Rhythmik. Der Gehalt von *PORB* nimmt in der ersten Hälfte des Tages zu und sinkt im weiteren

Verlauf auf ein basales, im Dunkeln konstantes Level (Armstrong et al., 1995). Die Expression von *PORC* unterliegt keiner oszillierenden Regulation, steigt aber bei höheren Lichtintensitäten an (Su et al., 2001).

Es wird angenommen, dass die PORs einen trimeren Komplex mit NADPH+H<sup>+</sup> und Pchl<sub>ide</sub> bilden (Griffiths, 1978). Dabei nutzt die POR das Pchl<sub>ide</sub> als eigenen Photorezeptor (Koski et al., 1951). Die Photoreduktion läuft *in vivo* innerhalb von Millisekunden ab und führt zur Umwandlung des in der Pflanze vorhanden Pchl<sub>ide</sub> zu Chl<sub>ide</sub> (Böddi et al., 2003).

#### 1.4.6 Die Synthese von Chlorophyll a und b

Im letzten Schritt der TBS wird ein Phytolrest an Chl<sub>ide</sub> a geknüpft (Chl-Synthase, CHLG) (Oster et al., 1997). Das entstandene Chl a ist zugleich Endprodukt und Substrat für die Bildung von Chl b (Abbildung 1.7). Chl a wird durch die CHLOROPHYLL(IDE) A OXYGENASE (CAO, Espineda et al. (1999)) zu Chlorophyll b oxidiert. Dabei wird die Methylgruppe am Ring B des Chl a zu einer Aldehydgruppe im Chl b umgewandelt. Durch die Reaktion einer CHL B REDUKTASE (CBR) und HYDROXY-CHL A REDUKTASE (HCAR) im sogenannten Chl-Zyklus kann Chl(ide) b wieder in Chl(ide) a überführt werden (Scheumann et al., 1996; Rudiger, 2002; Meguro et al., 2011; Tanaka und Tanaka, 2011) (Abbildung 1.7).

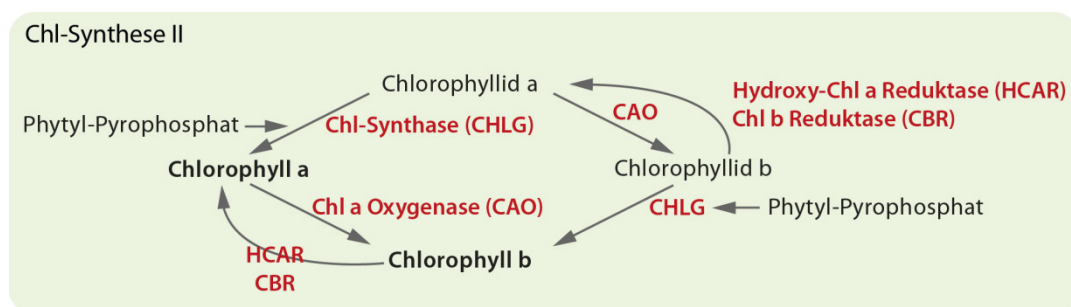


Abbildung 1.7: Die Reaktionen des Chlorophyll-Zyklus.

## 1.5 Die MgCh: ein Multiproteinkomplex

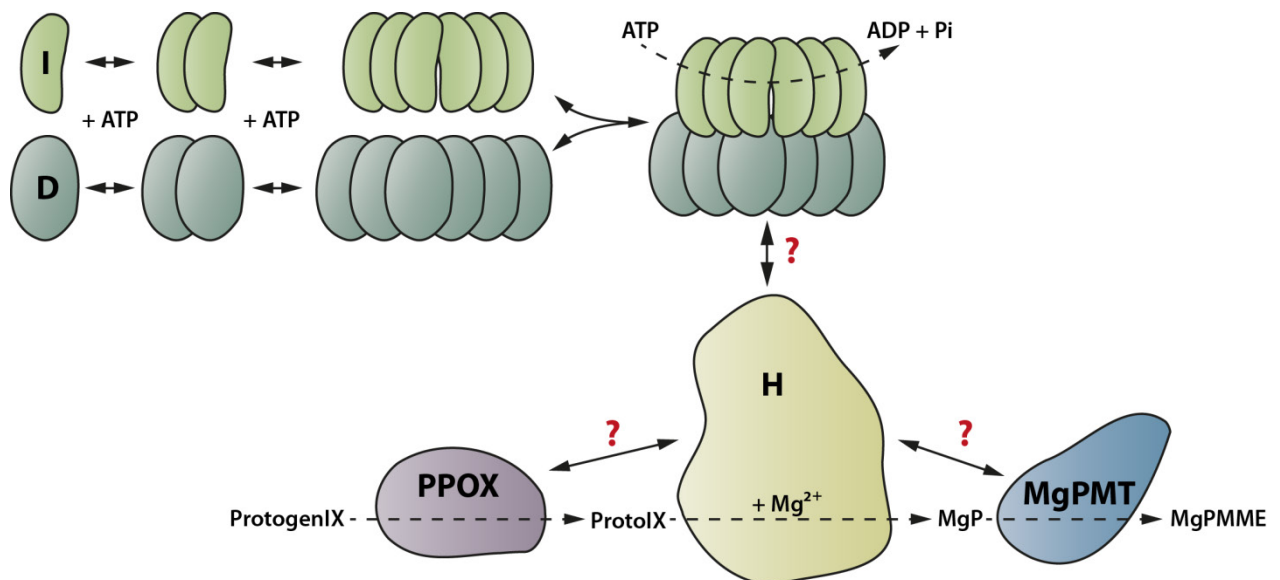
Am Verzweigungspunkt der TBS leitet die MgCh die Synthese von Chl ein. Sie katalysiert die Insertion des für das Chl charakteristische zentrale Mg-Ion in ProtoIX und ist daher, wie auch andere, ein wichtiges Enzyme für die Synthese von photosynthetisch aktiven Pigmenten (Castelfranco et al., 1979). Eine Verminderung oder gar der Verlust der MgCh-Aktivität führt zu einer reduzierten Vitalität, oder dem Absterben photoautotropher Organismen im Licht (zum Beispiel Jensen et al. (1996a); Willows et al. (1996); Kannangara et al. (1997); Papenbrock et al. (2000a); Papenbrock et al. (2000b); Mochizuki et al. (2001); Peter und Grimm (2009)).

Bereits frühe Analysen in *Rhodobacter capsulatus*, ein Bakteriochlorophyll (Bchl) synthetisierendes Proteobakterium, führten zur Identifikation eines für die Umwandlung von ProtoIX wichtigen und aus drei Genen bestehenden langen „Photosynthese-Cluster“ (Bollivar et al., 1994b). Die als *bchl*, *bchD* und *bchH* bezeichneten Gene wurden ebenfalls in Cyanobakterien, dort als *chlI*, *chlD* und *chlH* benannt, identifiziert und der Reaktion eines ProtoIX umsetzenden Proteinkomplexes zugeordnet (Gibson et al., 1995; Jensen et al., 1996b; Willows et al., 1996). Die homologen Proteine aus Pflanzen (CHLI, CHLD, CHLH) wurden mit Hilfe der chlorotischen *xantha* (gr: gelb) Mutanten von Gerste identifiziert (*xantha-h* (CHLI), *xantha-g* (CHLD) und *xantha-f* (CHLH), Jensen et al. (1996a)). Enzymologische Analysen zur Umwandlung von ProtoIX legten zudem nahe, dass die Reaktion der MgCh abhängig von ATP ist (Gorchein, 1972; Castelfranco et al., 1979). Zudem muss die MgCh zunächst aktiviert werden, bevor die Insertion des Mg-Ions in ProtoIX vollzogen werden kann (Walker und Weinstein, 1991a; Walker und Weinstein, 1991b). Dabei sei die Aktivierung des Komplexes von der Anwesenheit und die Mg<sup>2+</sup>-Insertion von der Hydrolyse von ATP abhängig (Walker und Weinstein, 1994; Jensen et al., 1999a).

Die MgCh, wie auch Nickel- und aerobe Kobalt-Chelatasen, werden der Klasse I von Metall-Chelatasen zugeordnet (Schubert et al., 1999). Im Gegensatz zur Klasse II (u.a. FC) ist die Hydrolyse von ATP für die Metall-Insertion der Klasse I Chelatasen notwendig. Die Gruppe der Klasse I Chelatasen ist zudem charakterisiert durch Enzymkomplexe, die sich aus 3 Untereinheiten zusammensetzen. Von diesen Untereinheiten katalysiert wenigstens eine die Hydrolyse von ATP (Schubert et al., 1999). So besteht auch der Komplex der Kobalt-Chelatase, welcher an der Synthese von Cobalamin (Vitamin B<sub>12</sub>) beteiligt ist, aus drei, zur MgCh homologen Untereinheiten (N, S, T, Crouzet et al. (1991); Debussche et al. (1992); Fodje et al. (2001)).

### 1.5.1 Der molekulare Motor der MgCh: die I und D Untereinheiten

Für die I Untereinheit der MgCh wurde eine ATPase-Aktivität nachgewiesen (Hansson und Kannangara, 1997; Jensen et al., 1999a; Hansson et al., 2002; Reid et al., 2003). Obwohl die D Untereinheit strukturelle Ähnlichkeiten zur I Untereinheit aufweist, hydrolysiert diese ATP nicht (Jensen et al., 1999a). Beide Untereinheiten, I und D, gehören zur Familie der ATPases ASSOCIATED WITH VARIOUS CELLULAR ACTIVITIES (AAA+), deren Mitglieder als „molekulare Motoren“ für Biosynthesen in Zellen fungieren. Im Zuge der Spaltung von ATP wird die freigesetzte Energie in einer Konformationsänderung der ATPase gespeichert und auf das Substrat des Motorkomplexes, eine katalytisch aktive Untereinheit, übertragen (Vale, 2000; Ogura und Wilkinson, 2001). Während die I Untereinheit (38-42 kDa) alle zur ATP-Hydrolyse notwendigen Aminosäuremotive aufweist (zum Beispiel ein Walker A und B- Motiv, Walker et al. (1982)), fehlen diese oder liegen in mutierter Form in CHLD vor (60-80 kDa) (Axelsson et al., 2006; Lundqvist et al., 2010).



**Abbildung 1.8: Modell zur Assemblierung der MgCh und Interaktionspartner der H Untereinheit.**

I Untereinheit (Grün), D Untereinheit (Blau-Grün), H Untereinheit (Beige), GUN4 (Orange), Protoporphyrinogen Oxidase (PPOX, Lila), MgP-Methyltransferase (MgPMT, Blau). Unterbrochene Pfeile zeigen enzymatisch katalysierte Reaktionen an. Durchgezogene Linien deuten auf Protein-Protein-Interaktionen. In Anwesenheit von ATP oligomerisieren die I und D Untereinheiten schrittweise zu einem Doppelring aus I und D Hexameren, welcher mit der H Untereinheit interagieren soll. Die Interaktion mit der PPOX und MgPMT sollen die Intermediatweitergabe ermöglichen. Weitere Erläuterungen im Text.

Ein weiteres Merkmal der AAA+ Proteine ist die Assemblierung zu oligomeren, zumeist hexameren Ringen in Anwesenheit von Nucleotiden (Vale, 2000; Ogura und Wilkinson, 2001). Dabei bilden sich ATP-Bindestellen zwischen zwei Untereinheiten aus. Elektronenmikroskopische- und Röntgenstrukturanalysen bestätigten die ringförmige Oligomerisierung von drei Bchl Dimeren (Willows et al., 2004; Lundqvist et al., 2010). Trotz des Ausbleibens einer ATP-Hydrolyse kann auch die D Untereinheit zu einem hexameren Ring oligomerisieren (Axelsson et al., 2006), welcher mit der

I Untereinheit interagieren soll (Lundqvist et al., 2010) (Abbildung 1.8). Dabei wird die Interaktion beider Ringe durch eine Vielzahl struktureller Komponenten ermöglicht und stabilisiert. Eine dieser Komponenten ist eine sogenannte Integrin I Domäne innerhalb des C-Terminus der D Untereinheit. In einem Modell reichen Aminosäuren dieser Domäne in die Dimer-Dimer-Interaktionsfläche der Untereinheiten im Bchl-Ring und stellen einen physikalischen Kontakt zwischen I- und D-Ring her. Somit entsteht ein funktioneller Komplex aus I und D Untereinheiten (Lundqvist et al., 2010) (Abbildung 1.8). Analog zu anderen AAA+-Systemen soll die D Untereinheit die Assemblierungsplattform für den I-Ring darstellen (Willows et al., 2004; Axelsson et al., 2006; Lundqvist et al., 2010). Die Interaktion zwischen I und D Untereinheit ist dynamisch und es wurde ein Austausch von Untereinheiten im I-D-Oligomer während der  $Mg^{2+}$  Insertion beschrieben (Lundqvist et al., 2013). Ob die (permanente) Interaktion der ATP hydrolysierenden I Untereinheit mit der D Untereinheit zur Übertragung der Energie auf die H Untereinheit notwendig ist, ist bisher ungeklärt.

### 1.5.2 Die katalytisch aktive H Untereinheit der MgCh

Im Zuge der Bindung von einem ProtoIX-Molekül (Jensen et al., 1996b; Willows et al., 1996; Karger et al., 2001; Qian et al., 2012) erfährt die H Untereinheit der MgCh eine umfangreiche Konformationsänderung (Sirijovski et al., 2008). Diese führt zur Biegung des Porphyrinringes und soll die Voraussetzung für den katalytischen Schritt der  $Mg^{2+}$  Insertion sein (Willows und Beale, 1998; Karger et al., 2001; Sirijovski et al., 2008; Chen et al., 2015a).

Obwohl die Struktur der H Untereinheit aufgeklärt wurde (Qian et al., 2012; Chen et al., 2015a), sind bisher keine experimentellen Hinweise zur Art der Interaktion des I-D-Oligomer mit der H Untereinheit publiziert. Auch die Frage nach der Nutzung der Energie aus der ATP-Hydrolyse im I-D-Oligomer durch die H Untereinheit ist Bestandteil aktueller Forschung (Hansson et al., 2013). Bereits bekannt ist hingegen, dass die D Untereinheit sowohl mit der I als auch mit der H Untereinheit interagieren und somit als Vermittler zwischen ATP-Hydrolyse und  $Mg^{2+}$  Insertion fungieren kann (Davison und Hunter, 2011) (Abbildung 1.8).

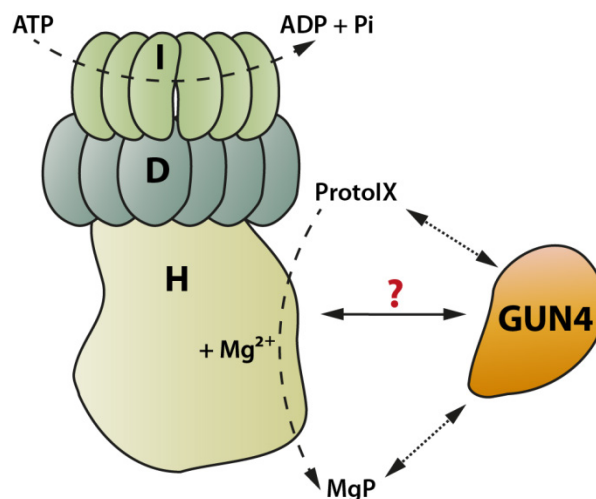
Neben den Untereinheiten der MgCh selbst, kann die H Untereinheit in Wechselwirkung mit anderen Proteinen der TBS treten. Im Rahmen der Substratweitergabe von ProtoIX von der vorhergehenden Reaktion der PPOX (Abbildung 1.2) erscheint die putative Interaktion eines PPOX-Dimers mit einem Dimer aus H Untereinheiten sinnvoll (Chen et al., 2015a) (Abbildung 1.8). Auch gibt es Belege für eine Interaktion der H Untereinheit mit der MgP-Methyltransferase (MgPMT), die die Umwandlung von MgP zu MgPMME katalysiert (Abbildung 1.8). Die Anwesenheit der H Untereinheit stimuliert die MgPMT-Aktivität *in vitro* (Hinchigeri et al., 1997; Shepherd et al., 2005) und *in vivo* (Alawady et al., 2005; Alawady und Grimm, 2005). Obwohl der Mechanismus der Stimulation unbekannt ist, wird

vermutet, dass die direkte Weitergabe des Produktes der MgCh-Reaktion an das folgende Enzym die Aktivität der MgPMT steigert.



## 1.6 GENOMES UNCOUPLED 4 (GUN4): ein Stimulator der MgCh

Mit der Entdeckung des GENOMES UNCOUPLED 4 (GUN4) wurde ein entscheidender Schritt hin zur Komplettierung der für die MgCh-Reaktion notwendigen Proteine vollzogen. Jedoch haben sich mit der Identifizierung von GUN4 viele Fragen aufgeworfen, die noch nicht alle beantwortet sind. So zeigte sich, dass GUN4 aus *Arabidopsis thaliana* einen Einfluss auf die Akkumulation von Chl nimmt (Mochizuki et al., 2001) und ein zusätzlicher Interaktionspartner der H Untereinheit aus oxygenen photosynthetisch aktiven Organismen ist (Larkin et al., 2003; Sobotka et al., 2008; Adhikari et al., 2009; Adhikari et al., 2011). Wenngleich nicht essentiell für die Umsetzung von ProtoIX zu MgP, stimuliert GUN4 die MgCh-Aktivität *in vitro* (Larkin et al., 2003; Davison et al., 2005) (Abbildung 1.9).



**Abbildung 1.9: Modell zur Interaktion von GUN4 mit der H Untereinheit der MgCh und Porphyrinen.**

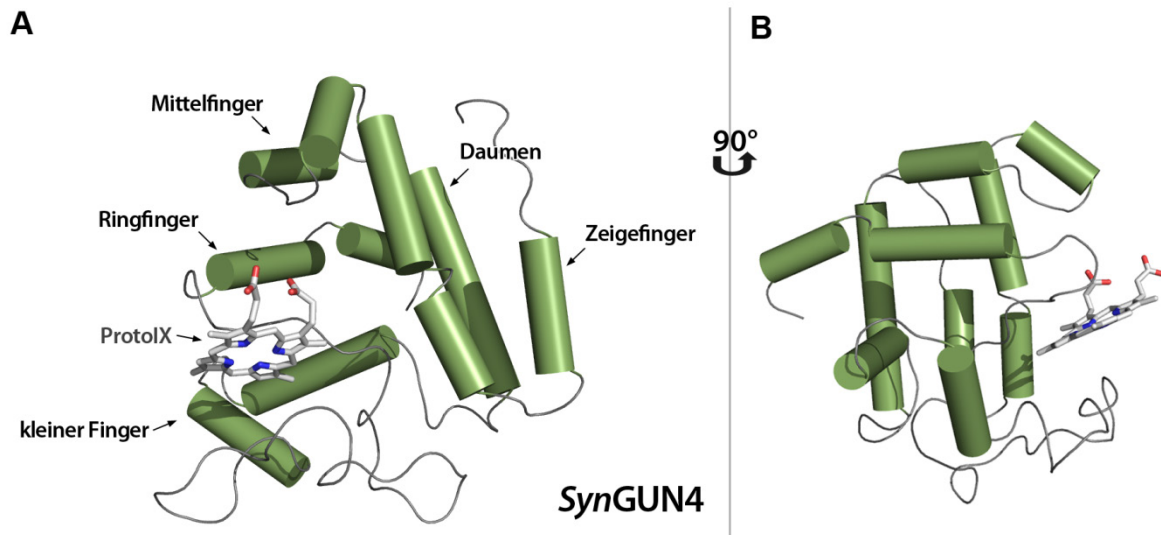
I Untereinheit (Grün), D Untereinheit (Blau-Grün), H Untereinheit (Beige), GUN4 (Orange). Gestrichelte Pfeile zeigen enzymatisch katalysierte Reaktionen an. Gepunktete Linien zeigen die Bindung von Porphyrinen an GUN4. Durchgezogene Linien deuten auf Protein-Protein-Interaktionen. GUN4 stimuliert die MgCh Reaktion durch einen unbekannten Mechanismus. Weitere Erläuterungen im Text.

Im physiologischen Kontext einzelliger Organismen ist GUN4 eine wichtige Komponente der MgCh. Der *knockout* von GUN4-Homologen in Cyanobakterien und Grünalgen führt zur Akkumulation des Substrates der MgCh, reduzierten Chl-Gehalten und einem lichtsensitiven Phänotyp (Wilde et al., 2004; Sobotka et al., 2008; Formighieri et al., 2012; Brzezowski et al., 2014). In *Arabidopsis thaliana* ist GUN4 essentiell für die Akkumulation von Chl. Im Tag-Nacht-Rhythmus akkumuliert eine *GUN4 knockout* Mutante kein Chl und stirbt nach der Ausbildung weißer Kotyledonen ab (Larkin et al., 2003; Peter und Grimm, 2009). Erst unter kontinuierlichem Schwachlicht und in Anwesenheit einer externen Kohlenstoffquelle akkumuliert die *gun4-2 (knockout)* Mutante 10% des Chl-Gehaltes von Wildtyp (WT) Pflanzen (Peter und Grimm, 2009). Der Chl-Gehalt der *gun4-2 (knockout)* Mutante kann zusätzlich durch die Fütterung von ALA gesteigert werden. *GUN4 knockdown* Mutanten (*gun4-3*) zeigen eine reduzierte ALA-Synthesekapazität und reduzierte *steady state* Gehalte von Intermediaten

der TBS. Daher hat GUN4 ebenfalls einen Einfluss auf die ALA-Synthese (Peter und Grimm, 2009). Es wird vermutet, dass der Einfluss auf die ALA-Synthese indirekt über die reduzierte MgCh-Aktivität in *gun4* vermittelt wird (siehe Abschnitt 1.7.3). Ursprünglich wurde das GUN4 Protein in einem Experiment zur Identifizierung von Komponenten des sogenannten retrograden Signalweges identifiziert. Weitergehende Ausführungen zum Komplex der retrograden Kommunikationswege in Pflanzen werden in Abschnitt 1.8 gegeben. Die in dem initialen Experiment erzeugte (Susek et al., 1993) und zu einem späteren Zeitpunkt isolierte und charakterisierte *gun4-1* Mutante (Mochizuki et al., 2001; Larkin et al., 2003), kodiert ein GUN4 mit einer Punktmutation. Die chemische Mutagenese (Ethylmethansulfonat, EMS) eines Basentriplets führt zum Austausch von Leucin an Position 88 zu Phenylalanin im GUN4-1 Protein (Larkin et al., 2003). Als Konsequenz einer reduzierten Stabilität des GUN4-1 akkumuliert die *gun4-1* nur ca. 10-20% des WT GUN4 Gehaltes und ist somit ebenfalls eine *knockdown* Mutante (Larkin et al., 2003).

### 1.6.1 GUN4 bindet Porphyrine

Weitergehende Analysen zum GUN4 haben gezeigt, dass das Protein unterschiedliche Porphyrinintermediate der TBS binden kann (Larkin et al., 2003; Adhikari et al., 2009). Dabei hat rekombinantes GUN4 aus *Synechocystis* und *Arabidopsis* die höchste Affinität gegenüber MgP, gefolgt von ProtoIX (Larkin et al., 2003; Davison et al., 2005; Verdecia et al., 2005; Adhikari et al., 2009; Chen et al., 2015c). Die Kristallisation des GUN4 aus Cyanobakterien und Grünalgen ergab eine neuartige Faltung für die Bindung von Porphyrinen (Davison et al., 2005; Verdecia et al., 2005; Chen et al., 2015c; Kopečna et al., 2015; Tarahi Tabrizi et al., 2015) (Abbildung 1.10). Die als *hand-shaped* bezeichneten Faltung von GUN4 erinnert an eine halbgeöffnete Hand, welche die Porphyrin-Bindetasche ausbildet (Abbildung 1.10 A und B). An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass trotz der Aufklärung der Struktur von GUN4 und der H Untereinheit der MgCh (Chen et al., 2015a; Chen et al., 2015b), bisher keine strukturellen Aussagen zur Art der Interaktion dieser beiden Komponenten der MgCh getroffen werden können. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass Porphyrine die Bindung von GUN4 an die MgCh und die Bindung des MgCh-Komplexes an die Thylakoidmembran fördern (Adhikari et al., 2009; Adhikari et al., 2011).



**Abbildung 1.10: Struktur von GUN4 aus *Synechocystis* (Syn) co-kristallisiert mit Deutero-ProtoIX.**

Die Strukturdatei (Datenbankeintrag 4XKC) wurde von Chen et al. (2015b) erzeugt und für diese Arbeit mittels PyMol bearbeitet und visualisiert. Das SynGUN4 zeigt eine *hand-shaped* Faltung. Für die Ansicht in (B), wurde die Struktur aus (A) um 90° gedreht. Weitere Erläuterungen im Text.

Da GUN4 bevorzugt das Substrat und Produkt der MgCh bindet, wurde der Zusammenhang zwischen der Stimulation der MgCh durch GUN4 und die Bindung von Porphyrinen an GUN4 in umfangreichen Studien analysiert (Larkin et al., 2003; Davison et al., 2005; Verdecia et al., 2005; Peter und Grimm, 2009; Chen et al., 2015c; Kopecna et al., 2015; Tarahi Tabrizi et al., 2015). Es wurde spekuliert, dass GUN4 als Substratbindepotein für die Reaktion der MgCh dient. Unterstützt durch die in etwa zehnfach höhere Affinität gegenüber MgP wurde ebenfalls diskutiert, dass GUN4 das Produkt der MgCh-Reaktion übernimmt (Abbildung 1.9). Beide Hypothesen würden die Stimulation der MgCh-Aktivität durch GUN4 erklären. *In vitro* Arbeiten mit mutierten GUN4 Proteinen, die eine veränderte Bindungsaffinität gegenüber den Porphyrinen haben, zeigten jedoch, dass es keinen Zusammenhang zwischen der Porphyrinbindung und Stimulation der MgCh gibt (Davison et al., 2005; Verdecia et al., 2005). So gibt es mutierte GUN4 Proteine, die keine Porphyrine binden können, aber eine WT-artige Stimulation der *in vitro* MgCh-Aktivität zeigen. Die Erhöhung der Affinität gegenüber Porphyrinen im GUN4-1 Protein hat weder einen positiven noch negativen Einfluss auf die Stimulationseffizienz der MgCh durch GUN4 (Davison et al., 2005).

Neben dem zuvor erwähnten Einfluss auf die ALA-Synthese, könnte GUN4 auch als Puffer für freie Porphyrine dienen, welche unter ungünstigen Wachstumsbedingungen akkumulieren könnten (Peter und Grimm, 2009; Brzezowski et al., 2014; Brzezowski et al., 2015). Dabei soll die Bindung der Porphyrine an GUN4 eine photoprotektive Funktion haben. Freie Porphyrine übertragen nach der Anregung durch Licht, Energie und Elektronen auf molekularen Sauerstoff und tragen so zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im Chloroplasten bei (siehe Abschnitt 1.7.1, Vavilin

und Vermaas (2002)). In (protein-) gebundener Form sollen sie von der Kollision mit Sauerstoff abgeschirmt und die Gefahr der Produktion von ROS minimiert werden. Dieser Theorie steht jedoch gegenüber, dass die Porphyrine nicht vollständig vom GUN4 umschlossen werden (Abbildung 1.10). Zusätzlich wurde gezeigt, dass rekombinantes GUN4 mit gebundenen Porphyrinen mehr ROS produziert, als freie Porphyrine (Tarahi Tabrizi et al., 2016).

Zusätzlich zu den beschriebenen Eigenschaften existieren Hinweise für einen Zusammenhang zwischen der Porphyrinbindung und der Stabilität von GUN4. Eine *Chlamydomonas* Mutante für die durch *CHLD-1* kodierte D Untereinheit der MgCh (*chld-1*), akkumuliert ProtoIX und ist durch eine post-translationale Reduktion des GUN4 charakterisiert (Brzezowski et al., 2014). Auch weitere *Chlamydomonas* Mutanten mit Defekten in Untereinheiten der MgCh weisen reduzierte GUN4-Gehalte auf (Prof. C. Beck, Universität Freiburg, nicht veröffentlicht). Wenngleich die *gun4-1* Mutante von *Arabidopsis* keine Porphyrine akkumuliert, ist auch das GUN4-1 Protein durch eine verringerte post-translationale Stabilität gekennzeichnet (Larkin et al., 2003). Porphyrinbindungsstudien mit dem GUN4-1 Protein lassen vermuten, dass eine erhöhte Affinität gegenüber ProtoIX und MgP zum Abbau des GUN4 in der *gun4-1* Mutante führt (Davison et al., 2005).

## 1.7 Regulation der Tetrapyrrolbiosynthese

Im Zuge der (langfristigen) Anpassung der Synthese von Tetrapyrrolen an variierende Wachstumsbedingungen, Umweltfaktoren und Entwicklungsstadien wird die TBS auf der Ebene der Transkription reguliert (Tanaka et al., 2011). Zur unmittelbaren Regulation der Enzyme des Stoffwechselweges haben sich hingegen verschiedene post-translationale Regulationsmechanismen entwickelt (Czarnecki und Grimm, 2012; Czarnecki und Grimm, 2013; Richter und Grimm, 2013; Brzezowski et al., 2015).

### 1.7.1 Über die Notwendigkeit zur Regulation des Intermediatflusses innerhalb der TBS

Wie jeder andere Biosyntheseweg muss auch die TBS an den Bedarf der Endprodukte unter variierenden Umweltbedingungen und Zeitpunkten in der Entwicklung einer Pflanze angepasst werden. Daher ist es nachvollziehbar, dass die TBS-Gene, die zur Synthese von Photosynthesepigmenten notwendig sind, eine unterschiedlich starke Expression im Licht und in der Dunkelheit zeigen. Nicht zuletzt die Koordinierung der Expression von TBS-Genen mit der Expression von Genprodukten, die die Tetrapyrrole binden (zum Beispiel LHCs), spielt hierbei eine wesentliche Rolle (Matsumoto et al., 2004). Um die ausbalancierte Synthese von Endprodukten unter anhaltenden Stressbedingungen, wie zum Beispiel Nährstoffmangel oder Kälte, zu gewährleisten, muss eine Anpassung der Transkriptionsraten erfolgen. Auf Beispiele zu dieser Art der Regulation der TBS wird in Abschnitt 1.7.2 (S.42) eingegangen.

Eine weitere Notwendigkeit zur Regulation der Enzyme der TBS leitet sich aus der phototoxischen Wirkung freier Porphyrine und Endprodukte der TBS ab. Ohne entsprechende Regulationsmechanismen können diese als Folge einer de-regulierten TBS akkumulieren und so die Produktion von ROS im Chloroplasten drastisch steigern (Meskauskiene et al., 2001; Vavilin und Vermaas, 2002; Kim et al., 2008; Triantaphylides und Havaux, 2009). Werden makrozyklische Intermediate der TBS durch Licht angeregt, kann die aufgenommene Energie auf molekularen Sauerstoff übertragen werden (siehe Abschnitt 1.2, S.21). In der Konsequenz wird dieser aus dem Triplett-Zustand ( $^3\text{O}_2$ ) in den Singulett-Zustand überführt. Es entsteht hochreaktiver Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) (Triantaphylides et al., 2008; Triantaphylides und Havaux, 2009). Neben  $^1\text{O}_2$ , welches aus der direkten Interaktion von Sauerstoff mit Porphyrinen entstehen kann, können in Pflanzen weitere ROS-Moleküle akkumulieren. Im Rahmen der Übertragung von Elektronen innerhalb der Photosynthese auf molekularen Sauerstoff kann das Superoxid-Anion entstehen ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), welches durch Superoxiddismutasen zu Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und weiter zu Wasser durch Peroxidasen detoxifiziert wird (Asada, 2006; Pospisil, 2012). Aus der Reaktion von  $\text{Fe}^{2+}$  mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Fenton- oder Haber-Weiss-Reaktion) entsteht das Hydroxyl-Radikal ( $\text{OH}^{\bullet}$ ), welches das größte Potential zur

oxidativen Schädigung von Zellbestandteilen aufweist (Halliwell und Gutteridge, 2007). In Abhängigkeit der ROS-Level und der Präsenz von detoxifizierenden Enzymen reichen die Folgen der ROS-Akkumulation von oxidativen Schädigungen von Proteinen und Lipidperoxidation bis hin zum Absterben der Pflanzenzelle (Kim et al., 2008; Fischer et al., 2013). Diese sich in Läsionen und Nekrosen der Blätter ausprägenden Effekte treten insbesondere dann auf, wenn die Kapazität zur ROS-Detoxifizierung im Zuge einer massiven Akkumulation von Porphyrinen überschritten wird (Mock et al., 1995; Mock und Grimm, 1997; Meskauskiene et al., 2001; Peter et al., 2010).

Somit ist die Vermeidung der unkontrollierten Akkumulation von Intermediaten und Endprodukten der TBS unter variierenden Umwelt- und Wachstumsbedingungen eine der größten Herausforderungen für die Pflanze.

### **1.7.2 Regulation der Genexpression von an der TBS beteiligten Genprodukten**

In den letzten Dekaden der Forschung an der TBS wurde eine Vielzahl von Faktoren für die Regulation der Expression von an der TBS beteiligten Genprodukten beschrieben. Diese wurden in umfangreichen Übersichtsartikeln zusammengefasst (u.a. Tanaka und Tanaka (2007); Tanaka et al. (2011)). Aufgrund dieser und der Tatsache, dass sich die vorliegende Arbeit hauptsächlich mit post-translationalen Regulationsmechanismen befasst, wird an dieser Stelle nur ein kurzer Einblick in die transkriptionelle Regulation der TBS gegeben.

In einem Experiment zur Untersuchung der lichtabhängigen, diurnalen und zirkadianen Expression wurden unterschiedliche Expressionsprofile für alle an der TBS beteiligten Gene gefunden (Matsumoto et al., 2004). Mit zwei Ausnahmen werden alle Gene der TBS in *Arabidopsis* im Licht induziert. Dennoch lassen sich unterschiedliche Expressionsgruppen definieren.

Eine Gruppe umfasst Gene und deren Genprodukte, die eine starke Zunahme der Expression innerhalb weniger Minuten nach dem Übergang vom etiolierten Zustand in das Licht zeigen. Zu dieser Gruppe zählen die durch *HEMA1* kodierte GluTR, die H Untereinheit der MgCh (*CHLH*), *CHL27*, eine Untereinheit der Cyclase, sowie die *CAO*. Diese Gene werden nicht nur in der ersten Tageshälfte (diurnal) induziert, sondern stehen ebenfalls unter zirkadianer Kontrolle. Im zweiten und dritten Cluster finden sich TBS-Gene, die nur eine moderate und deutlich verzögerte Induktion der Expression (+3h, bzw. +6h nach dem Übergang in das Licht) zeigen. Diese beiden Gruppen umfassen im Wesentlichen die verbleibenden Gene der TBS. Diese lassen sich jedoch hinsichtlich der diurnalen und zirkadianen Kontrolle ihrer Expression zusätzlich einteilen. Genprodukte, die an der Synthese von Chl beteiligt sind, zeigen eine deutliche Induktion zu Beginn und eine Repression zum Ende des Tages. Enzyme, die an der Hämsynthese beteiligt sein sollen, werden im Verlauf eines Tages weder

induziert, noch reprimiert. In einer vierten Gruppe finden sich *PORA* und *B* deren Expression im de-etiolierten Gewebe reprimiert wird (Matsumoto et al., 2004).

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse unterstützen eine bedarfsabhängige Synthese von TBS-Endprodukten im Verlaufe eines Tages oder im Übergang von der Keimung hin zur Ausbildung photosynthetischen Gewebes. Während Chl nur im Licht benötigt wird, muss die Hämsynthese für nicht-photoautotrophe Prozesse im Dunkeln aufrechterhalten werden.

Heute kennt man eine Reihe von Faktoren, die einen Einfluss auf die licht- und entwicklungsabhängige Regulation der Transkription haben und essentiell für die Akkumulation von TBS Enzymen sind.

Beispielhaft seien hier die Studien zur Expression der GluTR genannt: das Phytohormon Cytokinin (Yaronskaya et al., 2006), Licht (Ilag et al., 1994), Phytochrome und Cryptochrome (Mc Cormac et al., 2001; Mc Cormac und Terry, 2002), Saccharide (Ujwal et al., 2002), aber auch freie Tetrapyrrole, wie MgP oder Häm (Vasileuskaya et al., 2005), regulieren die Expression von *HEMA*-Genen.

Matters und Beale (1995) zeigten eine durch einen Blau-Licht-Rezeptor abhängige Expression von GSAT und PBS in *Chlamydomonas*, die im direkten Zusammenhang mit der Genexpression für Chlorophyllbindeproteine steht. Zusätzlich wird in Anpassung an unterschiedliche Lichtintensitäten, vermittelt durch den Redox-Zustand des Plastoquinon-Pools, die Transkription einzelner Enzyme der TBS induziert (Durnford und Falkowski, 1997; Wilson und Huner, 2000).

In Ergänzung zur zirkadianen Rhythmik der Expression der MgCh H Untereinheiten, deuten verschiedene Befunde auf eine Beteiligung der MgCh im regulatorischen Netzwerk der TBS hin. In Tabak-Antisense Pflanzen mit reduziertem Gehalt an *CHLH* und verringerter MgCh-Aktivität wurden verringerte Mengen von *HEMA* und *ALAD*-Transkripten beobachtet (Papenbrock et al., 2000). Dies führte zu einer verminderten ALA-Synthesekapazität und folglich zu geringeren Gehalten von ProtoIX, MgP und MgPMME. Die veränderte Expression von *CHLH*, oder die geringere Aktivität der MgCh, bewirkt demnach eine veränderte Expression von *HEMA* und *ALAD*.

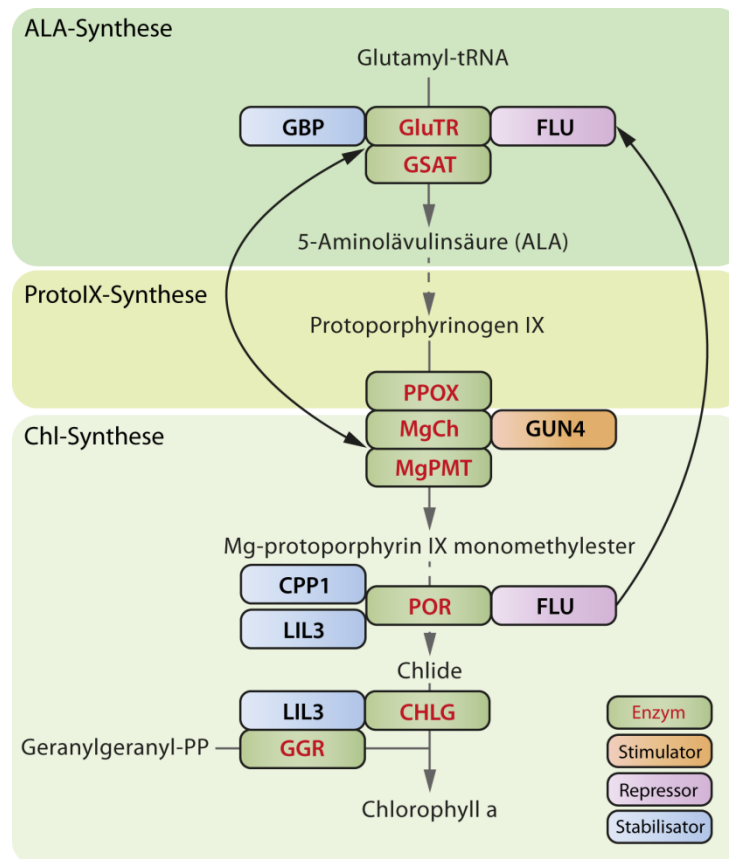
### 1.7.3 Post-translationale Kontrolle enzymatischer Schritte der Tetrapyrrolbiosynthese

Bedingt durch die Zeit, die für die Übersetzung eines Stimulus in eine Veränderung der Transkription eines Genes benötigt wird, können Pflanzen im Rahmen der Genexpression nur verzögert auf veränderte Bedingungen reagieren. Daher mussten sich post-translationale Regulationsmechanismen entwickeln, die eine schnelle Anpassung der Enzymaktivitäten der TBS erlauben.

### **Regulation durch Protein-Protein-Interaktion**

Eine Strategie zur Regulation des Flusses von Intermediaten innerhalb der TBS und zur Vermeidung der Akkumulation von phototoxischen Porphyrinen besteht in der Bildung von Multienzymkomplexen (Abbildung 1.11). In Ergänzung zu oligomeren Enzymkomplexen, die die Umsetzung eines Substrates katalysieren (MgCh oder Cyclase), kann die Bildung von Multienzymkomplexen die Substratweitergabe zwischen den Enzymen der TBS unterstützen. Durch die koordinierte Weitergabe kann so die Akkumulation freier Zwischenstufen des Stoffwechselweges unterbunden werden. Dieses Konzept wird zum Beispiel innerhalb der ALA-Synthese, aber auch der initialen Schritte des Mg-Zweiges der TBS umgesetzt. Anhand von Strukturanalysen wurde zunächst vermutet, dass die GluTR mit dem folgenden Enzym (GSAT) interagieren kann (Hennig et al., 1997; Moser et al., 2001). Die tatsächliche physikalische Interaktion dieser beiden Proteine wurde durch biochemische Analysen an bakterieller GluTR und GSAT untersucht und die Möglichkeit zur Weitergabe des instabilen Glutamat-1-Semialdehyd von der GluTR auf die GSAT bestätigt (Luer et al., 2005) (Abbildung 1.11). Auch die zuvor beschriebene Interaktion zwischen der H Untereinheit der MgCh mit der PPOX und der MgPMT (siehe Abschnitt 1.5.2, S.35) steht im direkten Zusammenhang mit einer optimierten Substratweitergabe zwischen den Enzymen. Zusätzlich wird die MgPMT-Reaktion durch einen unbekannten Mechanismus von der H Untereinheit der MgCh stimuliert (Hinchigeri et al., 1997; Alawady et al., 2005; Alawady und Grimm, 2005; Shepherd et al., 2005; Chen et al., 2015a).





**Abbildung 1.11: Protein-Protein- und regulatorische Interaktionen innerhalb der TBS.**

Diese Abbildung beschränkt sich auf die Interaktionen von TBS Proteinen mit nicht-enzymatisch aktiven Proteinen und die Darstellung der Komplexbildung zwischen einzelnen Enzymen (Grün) der TBS. Sowohl die Interaktion mit Stabilisatoren (Blau), hemmenden Proteinen (Lila), als auch mit Stimulatoren (Orange) bestimmt die Aktivität der Enzyme und den Fluss von Intermediaten durch die TBS. Die durchgezogenen Pfeile (schwarz) zeigen *feedback* Regulationsmechanismen an. Die Enzymabkürzungen sind in Rot dargestellt. Geranylgeranyl-PP, Geranylgeranyl-Pyrophosphat. Weitere Erläuterungen im Text.

Auch die Interaktion von Enzymen der TBS mit nicht-enzymatisch aktiven Proteinen hat einen Einfluss auf ihre Aktivität und Stabilität (Abbildung 1.11). Es wurde eine Interaktion zwischen der GluTR und einem GluTR-Bindeprotein (GBP, Jung und Chory (2010); Czarnecki et al. (2011)) beschrieben. Von dieser Interaktion wurde zunächst vermutet, dass sie zur räumlichen Trennung eines Teiles der GluTR-Moleküle von der dominanten ALA-Synthese für Chl notwendig ist (Czarnecki et al., 2011). Ferner lassen ergänzende Analysen vermuten, dass das GBP einen stimulierenden Einfluss auf die Aktivität (Zhao et al., 2014) und der durch die CASEINOLYTIC PROTEASE (CLP) bestimmten Stabilität der GluTR hat (Nishimura et al., 2015; Apitz et al., 2016).

Auch die Geranyl-Geranyl-Reduktase (GGR), die Phytyl-Pyrophosphat bereitstellt, wird durch eine Proteininteraktion stabilisiert (Tanaka et al., 2010) (Abbildung 1.11). Durch die Interaktion mit den zwei Isoformen des LIGHT HARVESTING LIKE PROTEIN 3 (LIL3) wird die GGR an die Thylakoidmembran gebunden und stabilisiert (Tanaka et al., 2010; Takahashi et al., 2014; Lohscheider et al., 2015). Zusätzlich bindet LIL3 Chl und Intermediate des Stoffwechselweges und

interagiert mit POR und der Chl-Synthase (CHLG) (Reisinger et al., 2008; Lohscheider et al., 2015; Mork-Jansson et al., 2015a; Mork-Jansson et al., 2015b). Für die POR wurde die Interaktion mit dem CHAPERONE-LIKE PROTEIN OF POR 1 (CPP1) als Voraussetzung zur Stabilisierung des Pchlde konvertierenden Enzyms beschrieben (Lee et al., 2013) (Abbildung 1.11).

Im engeren Sinne gehört natürlich die Interaktion der H Untereinheit der MgCh mit dem Stimulator GUN4 zur Gruppe der Interaktion von nicht-enzymatisch aktiven Proteinen, die einen Einfluss auf Enzyme der TBS haben (siehe Abschnitt 1.6, Abbildung 1.11).

Neben dem positiven Einfluss können Proteininteraktionen auch eine Repression der enzymatischen Reaktionen der TBS vermitteln (Abbildung 1.11). Wenngleich der genaue Mechanismus bisher nicht verstanden ist, gibt es in Pflanzen eine post-translationale Wechselbeziehung zwischen den Enzymen der ALA-Synthese und den ersten Schritten der Chl-Synthese. Eine *Chlamydomonas gun4* Mutante akkumuliert erhebliche Mengen an ProtoIX, dem Substrat der MgCh (Brzezowski et al., 2014). Im Gegensatz zu *Chlamydomonas* akkumulieren *Arabidopsis gun4* und *gun5* (MgCh H Untereinheit) Mutanten keine Porphyrine, sind jedoch durch eine Reduktion der ALA-Synthese gekennzeichnet (Mochizuki et al., 2001; Larkin et al., 2003; Peter und Grimm, 2009). Auch Antisense-Linien von Tabak mit reduzierter Expression der MgPMT zeigen eine Reduktion der ALA-Synthese (Alawady und Grimm, 2005). Diese Reduktion wird als *feedback* Mechanismus zur Vermeidung der Akkumulation von Porphyrinen angesehen. Gleichzeitig geht von den Enzymen der ALA-Synthese eine *feedforward* Regulation der Reaktionen im Chl-Zweig der TBS aus (Abbildung 1.11). Tabak Antisense-Linien für GluTR (*HEMA1*) und GSAT zeigen eine Reduktion der MgCh-Aktivität (Hedtke et al., 2007).

Eine der wichtigsten, wenngleich auf molekularer Ebene nur in Ansätzen charakterisierte Protein-Protein-Interaktion innerhalb der TBS, ist die Repression der ALA-Synthese durch FLUORESCENT IN BLUE LIGHT (FLU) (Meskauskiene et al., 2001; Meskauskiene und Apel, 2002; Lee et al., 2003; Goslings et al., 2004; Kauss et al., 2012; Zhang et al., 2015) (Abbildung 1.11). Bedingt durch die strikt lichtabhängige Umwandlung von Pchlde zu Chlide durch die POR der Angiospermen, muss die Synthese von Pchlde(-Vorstufen) in der Dunkelheit reduziert werden. Fehlt das FLU-Protein, wird die ALA-Synthese nicht reprimiert und die *flu* Mutanten von *Arabidopsis* und Gerste akkumulieren große Mengen von Pchlde in einer Dunkelpphase. In der folgenden Lichtphase führt das freie Pchlde zur Photosensibilisierung der Zelle. Die akkumulierenden ROS (hauptsächlich  $^1\text{O}_2$ ) führen zur Oxidation von Biomolekülen und induzieren den programmierten Zelltod (Kim et al., 2012; Kim und Apel, 2013b). Die Repression der ALA-Synthese wird durch die Bindung der GluTR an einen Komplex aus FLU und POR-Pchlde vermittelt (Abbildung 1.11) (Richter et al., 2010; Kauss et al., 2012; Zhang et al., 2015). Im Vergleich zu WT-Pflanzen haben *flu* Mutanten auch eine höhere ALA-Syntheserate im Licht (Goslings et al., 2004). Zusätzlich gibt es in Gerste eine negative Korrelation zwischen der ALA-

Synthesekapazität und den *steady state* Gehalten von Pchl<sub>ide</sub> im Licht (Richter et al., 2010). Daher scheint FLU auch an der Regulation der ALA-Synthese im Licht beteiligt zu sein.

Neben der Repression der GluTR durch FLU, soll Häm einen negativen Einfluss auf die ALA-Synthese haben (Cornah et al., 2003). Unterstützt wird diese Annahme durch Analysen von N-terminal verkürzter GluTR aus Gerste, welche nicht sensitiv gegenüber Häm ist. Dabei soll der N-Terminus nicht essentiell für die Katalyse (Vothknecht et al., 1998) und Interaktion der GluTR mit FLU (Goslings et al., 2004) sein. Zusätzlich zeigen Extrakte von *Chlorella*, *Synechocystis* und *Chlorobium* nach Zugabe von Häm eine reduzierte GluTR-Aktivität (Weinstein und Beale, 1985; Rieble und Beale, 1988; Rieble et al., 1989; Weinstein et al., 1993). Aufgereinigte GluTR aus Gerste zeigt bei einer mM-Konzentration von Häm eine Abnahme der Aktivität (Pontoppidan und Kannangara, 1994a). In *C. reinhardtii* soll es einen zusätzlichen Proteinfaktor für die Häm-abhängige Regulation der ALA-Synthese geben (Srivastava et al., 2005). Wenngleich diese Art der metabolischen Kontrolle auch in Bakterien, Hefen und Säugetieren beschrieben wurde (Woodard und Dailey, 1995; Smith und Cox, 1997), muss festgehalten werden, dass die *in vitro* Analysen mit unphysiologisch hoher Konzentration von Häm durchgeführt wurden und ein artifizieller Effekt von Häm nicht ausgeschlossen werden kann (Haile et al., 1990). Aus der Analyse von Enzymen, die am Abbau des Häms beteiligt sind, wurde ebenfalls ein negativer Einfluss von Häm auf die GluTR abgeleitet. *Arabidopsis* Mutanten für die HÄMOXYGENASE (*hy1*, Davis et al. (1999)) und PHYTOCHROMOBILIN SYNTHASE (*hy2*, Kohchi et al. (2001)) sollen einen erhöhten Hämgehalt im Vergleich zum WT haben. Akkumulierendes Häm soll für die Hemmung der GluTR und damit für die geringere ALA-Synthese und Pchl<sub>ide</sub>-Akkumulation in den Phytochrom-defizienten Mutanten verantwortlich sein (Goslings et al., 2004). Der vermeintliche Pool von regulatorischem Häm wurde jedoch bis *dato* weder qualitativ, noch quantitativ beschrieben.

### Redox-Regulation der Enzyme der TBS

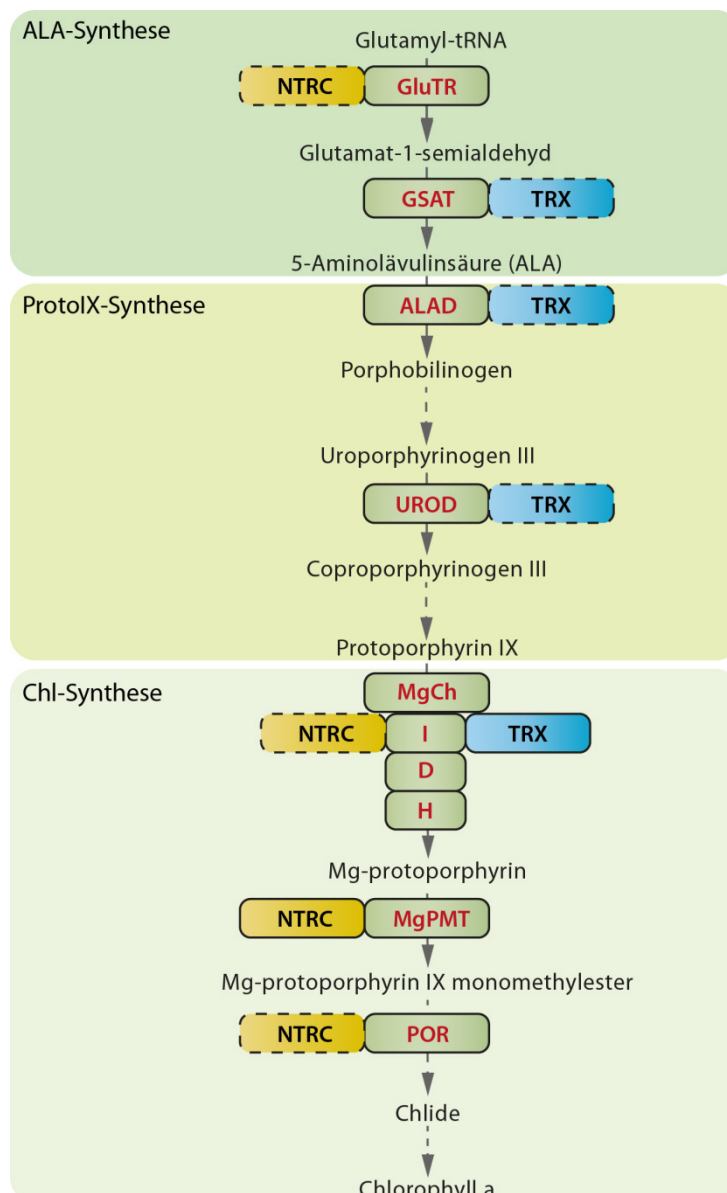
Als eine Folge der photosynthetischen Aktivität der Chloroplasten variiert der Redox-Status in diesem Organell in Abhängigkeit vom Lichtangebot und Entwicklungszustand (Buchanan und Balmer, 2005; Rochaix et al., 2012; Dietz und Hell, 2015). Daher ist es sinnvoll anabole oder katabole Reaktionen, die unterschiedliche Aktivitäten während des Tages oder der Nacht haben, an die Photosyntheseaktivität zu koppeln. Dabei spielen der Redox-Zustand von FERREDOXIN, THIOREDOXIN (TRX), des Plastoquinon (PQ)-Pool oder der NADPH-Gehalt eine entscheidende Rolle. Es sind redox-abhängige Regulations-mechanismen innerhalb des Calvin-Zyklus, der Stärkesynthese oder der Photosynthese selbst (*state transition*) bekannt (Buchanan und Balmer, 2005; Geigenberger et al., 2005; Michalska et al., 2009; Rochaix et al., 2012; Thormahlen et al., 2013).

Die Notwendigkeit für die Redox-Regulation basiert auf dem Umstand, dass Thiolgruppen (-SH) von schwefelhaltigen Aminosäuren (hauptsächlich Cystein) einen unterschiedlichen Redox-Zustand

einnehmen können. In Abhängigkeit des (sub-)plastidären Redox-Milieus und dem Gehalt von ROS werden die Seitengruppen von Cysteinen oxidiert (Dalle-Donne et al., 2009; Triantaphylides und Havaux, 2009). Reagieren die Thiolgruppen der Cysteine mit molekularem Sauerstoff, können diese zu Sulfen- (-SOH) oder die irreversiblen Formen, Sulfin- (-SO<sub>2</sub>H) oder Sulfonsäure (-SO<sub>3</sub>H), oxidiert werden. In Anwesenheit eines zweiten Thiols (zum Beispiel Glutathion oder ein weiteres Cystein) können sich Disulfidbrücken ausbilden. Diese entstehen entweder innerhalb eines Proteins (intramolekular) oder mit einem zweiten Polypeptid (intermolekular). Eine intermolekulare Disulfidbrücke kann beispielsweise Protein-Protein-Interaktion stabilisieren. Als Folge der Oxidation haben katalytisch aktive oder regulatorische Cysteine einen Einfluss auf die strukturelle Integrität, Stabilität oder Aktivität eines Proteins (Buchanan und Balmer, 2005; Luo et al., 2012; Richter et al., 2013).

Die Rückreaktion, sprich die Reduktion von oxidierten Cysteinen in Disulfidbrücken, kann durch Redox-Regulatoren katalysiert werden. Eine Gruppe von Redox-Regulatoren umfasst die TRX (Chibani et al., 2010). TRX-Isoformen können Elektronen auf oxidierte Cysteine übertragen und so die Öffnung von Disulfidbrücken katalysieren. Im Zuge der Reaktion werden die katalytisch aktiven Cysteine der TRX oxidiert. Durch das FERREDOXIN, dessen Redoxzustand an die Photosynthese gekoppelt ist, werden TRXs reduziert und wieder aktiviert. Ein zweiter plastidärer Redox-Regulator ist die NADPH-abhängige THIOREDOXIN REDUCTASE C (NTRC). Im Gegensatz zu den TRXs hat NTRC eine duale Aktivität (Serrato et al., 2004). Innerhalb der TRX-Reduktase Domäne wird NADPH oxidiert und die Elektronen auf die NTRC-eigene TRX-Domäne übertragen. Die TRX-Domäne vermittelt anschließend die Interaktion mit und die Reduktion von einem Zielprotein (Serrato et al., 2004; Perez-Ruiz et al., 2006; Spinola et al., 2008; Perez-Ruiz und Cejudo, 2009). Da NTRC Elektronen der NADPH-Oxidation nutzt, ist die Aktivität von NTRC unabhängig von der Aktivität der Photosynthese. In Abwesenheit von Licht kann NADPH über die Reaktionen des oxidativen Phosphatwegs bereitgestellt werden.

Sowohl für die TRX, als auch für NTRC wurde eine Vielzahl von Zielproteinen beschrieben. Beide Gruppen spielen daher eine essentielle Rolle in der redox-abhängigen Regulation von Proteinen und Prozessen des plastidären Metabolismus (Serrato et al., 2004; Perez-Ruiz et al., 2006; Stenbaek et al., 2008; Kirchsteiger et al., 2009; Lepistö et al., 2009; Pulido et al., 2010; Wulff et al., 2011; Bernal-Bayard et al., 2012; Bohrer et al., 2012; Cejudo et al., 2012; Li et al., 2012; Richter et al., 2013; Toivola et al., 2013; Nikkanen et al., 2016).



**Abbildung 1.12: Übersicht über redox-regulierte Schritte der TBS.**

Diese Abbildung beschränkt sich auf die Darstellung von belegten Interaktionen und Regulationsmechanismen, die durch die NADPH-abhängige THIOREDOXIN REDUCTASE C (NTRC, Gelb) und THIOREDOXINE (TRX, Blau) vermittelt werden. Die Enzyme sind in Grün, die Enzymabkürzungen in Rot dargestellt. Gestrichelte Rahmen zeigen Interaktionen, deren experimentelle Hinweise eingehender analysiert werden müssen. Weitere Erläuterungen im Text.

Auch innerhalb der TBS wurden Enzymschritte identifiziert, die (möglicherweise) über die zuvor genannten Redox-Regulatoren reguliert werden (Abbildung 1.12) (Richter und Grimm, 2013). In einem Experiment zur Identifizierung von plastidären Zielproteinen für TRX-abhängige Regulation wurden die Glutamat-1-Semialdehydtransferase (GSAT), die ALA-Dehydratase (ALAD) und die Uroporphyrinogen-Decarboxylase (UROD) identifiziert (Balmer et al., 2003). Im Gegensatz zu den zuvor genannten Enzymen, wurden bereits umfangreichere Analysen zur Redox-Regulation der MgCh publiziert. Bereits im Jahr 2000 wurde eine von reduzierten Cysteinen abhängige Aktivität der I Untereinheit der MgCh beschrieben (Jensen et al., 2000). Weiterführende Analysen zeigten, dass die

ATPase-Aktivität von CHLI durch eine Disulfidbrücke, die *in planta* durch TRX reduziert wird, reguliert werden kann (Ikegami et al., 2007; Luo et al., 2012) (Abbildung 1.12). Zusätzlich zeigen *in vitro* Experimente, dass auch NTRC eine reduzierende Aktivität gegenüber Cysteinen der I Untereinheit hat (Perez-Ruiz et al., 2014), welche jedoch keine Rolle für die Aktivierung der MgCh *in vivo* spielt (Luo et al., 2012). Vielmehr geht aus der Analyse einer *ntrc* Mutante hervor, dass NTRC einen Einfluss auf den Redox-Zustand der GluTR und MgP-Methyltransferase (MgPMT) hat (Richter et al., 2013) (Abbildung 1.12). Es wird angenommen, dass die MgPMT, aufgrund der verminderten Reduktion von Cysteinen in der *ntrc* Mutante, in eine inaktive, oxidierte Konformation gelangt, welche abgebaut wird (Richter et al., 2013; Richter et al., 2016c).

#### **1.7.4 Proteinphosphorylierung: eine neue Ebene der Regulation der Tetrapyrrolbiosynthese**

##### **Mechanismus der Proteinphosphorylierung und *state of the art* plastidärer Phosphoproteine**

Neben anderen post-translationalen Modifikationen (PTM) von Proteinen ist die Proteinphosphorylierung eine der wichtigsten PTMs in allen Organismen (Adams, 2001). In den Plastiden der Pflanzen hat unter anderem die Phosphorylierung von Proteinen einen Einfluss auf enzymatische Reaktionen innerhalb von Stoffwechselwegen, organelläre Importprozesse, Signaltransduktions-kaskaden, subzelluläre Lokalisation oder die Genexpression (Baginsky und Gruissem, 2009; Schönberg und Baginsky, 2012; Friso und van Wijk, 2015; Baginsky, 2016). Im Wesentlichen führt die Übertragung der  $\gamma$ -Phosphatgruppe eines Nucleosidtriphosphates (ATP oder GTP) auf ein Zielprotein zur Einführung einer negativ geladenen Seitengruppe. Als Akzeptoren für die durch Proteinkinasen katalysierte Reaktion fungieren (hauptsächlich) die Aminosäuren Serin (Ser), Threonin (Thr) und Tyrosin (Tyr), wobei diese mit einer unterschiedlichen Häufigkeit innerhalb von pflanzlichen Phosphoproteomstudien detektiert wurden (Ser 75%–80%, Thr 15%–20% und Tyr 1%–5%) (van Wijk et al., 2014; Friso und van Wijk, 2015). Für die Phosphoproteine der Plastiden fehlen jedoch überzeugende Belege für eine Tyr-Phosphorylierung (Lu et al., 2015a; Baginsky, 2016). Zum Teil existieren Belege dafür, dass die Phosphorylierungsstelle in eine kinasespezifische Erkennungssequenz eingebettet ist. Dabei sollen jedoch die chemischen Eigenschaften - zum Beispiel die Häufung „saurer“ Aminosäuren - mehr als die exakte Abfolge von Aminosäuren ausschlaggebend für die Erkennung eines Substrates durch die Proteinkinase sein (Reiland et al., 2009). Die Dephosphorylierung wird durch die Klasse der Phosphatasen katalysiert. Die PTM durch Phosphorylierung ist reversibel und somit geeignet, eine schnelle Anpassung an variierende Faktoren und Stimuli zu ermöglichen.

Bedingt durch die negative Ladung der phosphorylierten Aminosäure ändern sich die physikochemischen Eigenschaften eines Phosphoproteins. Die Veränderung der Struktur kann das phosphorylierte Protein, zum Beispiel vom inaktiven in einen aktiven Zustand überführen (oder umgekehrt). Gleichzeitig kann die Existenz der Phosphatgruppe einen Einfluss auf die Affinität eines Enzyms gegenüber einem Substrat oder auf eine Protein-Protein-Interaktion haben (Adams, 2001).

Wenngleich das Wissen zu spezifischen Kinase-Substrat-Phosphatase-Interaktionen und den physiologischen Konsequenzen der Phosphorylierung plastidärer Proteine noch sehr limitiert ist, gibt es einzelne Beispiele, die in den vergangenen Jahren intensiv studiert wurden (Baginsky und Gruissem, 2009; Schönberg und Baginsky, 2012; Baginsky, 2016). Eine der wohl am besten verstandenen Kinase-Substrat-Interaktionen im Plastiden ist die Phosphorylierung von LHCII-Proteinen durch die STATE TRANSITION KINASE (STN) 7 (Bellafiore et al., 2005; Bonardi et al., 2005). Der Prozess des *state transition* beschreibt die Umverteilung eines mobilen Anteils peripherer Antennenkomplexe des PSII (LHCII) unter variierenden Lichtbedingungen. Dabei wurden zwei Zustände definiert: im *state 1* sind die LHCII mit dem PSII, im *state 2* hingegen mit dem PSI assoziiert (Rochaix et al., 2012; Rochaix, 2013). Dieser Prozess wird durch die STN7 Kinase induziert, welche die LHCII im *state 2* phosphoryliert. Phosphorylierte LHCII dissoziieren vom PSII und binden an das PSI. Während der *state 1* durch eine vorrangige Anregung des PSI definiert ist, wird das PSII im *state 2* verstärkt angeregt. Als eine Folge des Wechsels zwischen *state 1* und *state 2* Licht kann es zur Störung des Redox-Gleichgewichtes innerhalb der photosynthetischen Elektronentransportkette kommen. In Anpassung an qualitative und quantitative Veränderungen des Lichtes soll durch die Umverteilung der Antennenkomplexe zwischen PSII und PSI einer ungleichen Anregung dieser entgegengewirkt werden. Es wurde bereits früh erkannt, dass die LHCII-Proteine in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von Licht phosphoryliert werden (Bennett, 1979). Dennoch dauerte es nahezu 30 Jahre, bis die LHCII-Kinase (STN7) identifiziert wurde und der Prozess des *state transition* eingehender analysiert werden konnte (Bellafiore et al., 2005; Bonardi et al., 2005). Neben den Faktoren, die die STN7 aktivieren und den physiologischen Konsequenzen einer aktivierten STN7, kennt man heute auch die Phosphatase, welche die De-phosphorylierung der LHCII katalysiert (TAP38/PPH1, Pribil et al. (2010)) (Pesaresi et al., 2011; Reiland et al., 2011; Willig et al., 2011; Puthiyaveetil et al., 2012; Rochaix et al., 2012; Tikkanen und Aro, 2012; Rochaix, 2013; Wunder et al., 2013a; Wunder et al., 2013b; Dietzel et al., 2015).

Neben der STN7 hat auch die THYLAKOID ASSOCIATED KINASE 1 (TAK1) das Potential LHCII-Proteine zu phosphorylieren (Snyders und Kohorn, 1999; Snyders und Kohorn, 2001). Auch eine weitere Kinase, die CHLOROPLAST SENSOR KINASE (CSK) ist indirekt an den Vorgängen der Photosynthese beteiligt. Je nach angebotener Lichtqualität (*state 1* oder *state 2*) aktiviert oder reprimiert die CSK die

Transkription von *psaA*, einer auf dem Plastom kodierten PSI-Untereinheit und ermöglicht somit die stöchiometrische Anpassung von PS-Untereinheiten unter variierenden Lichtbedingungen (Puthiyaveetil et al., 2008).

In Ergänzung zu den mit der Photosynthese assoziierten Proteinkinasen findet sich in den Plastiden eine weitere Kinase, die hauptsächlich für die Phosphorylierung stromalokalisierter Proteine verantwortlich ist (Bayer et al., 2012). Die plastidäre CASEIN KINASE 2 ( $\alpha$ ) (cpCKII oder auch PLASTID TRANSCRIPTION KINASE, PTK; Baginsky et al. (1999); Ogrzewalla et al. (2002); Salinas et al. (2006)) phosphoryliert eine Untereinheit der ATP-Synthase (ATPB; Kanekatsu et al. (1993)), eine Komponente zur LHC-Integration in Thylakoidmembranen (ALB3; Schönberg et al. (2014)), sowie Komponenten der plastidären Genexpressionsmaschinerie (Kanekatsu et al., 1993; Lisitsky und Schuster, 1995; Liere und Link, 1997; Ogrzewalla et al., 2002; Jeong et al., 2004; Kleffmann et al., 2007).

Ergänzt wird die Liste der plastidären Proteinkinasen durch die Familie der ABC1-LIKE KINASE (ABC1K). In *Arabidopsis* umfasst die ABC1K-Familie 17 Mitglieder (Lundquist et al., 2012) von denen sechs in den Plastoglobuli der Plastiden nachgewiesen wurden (Ytterberg et al., 2006; Lohscheider et al., 2016). Im Vergleich zu „klassischen“ Proteinkinasen sind hochkonservierte Kinasedomänen (Hanks et al., 1988) in den ABC1K mutiert. Wenngleich für die ABC1K1 eine Proteinkinaseaktivität nachgewiesen wurde (Martinis et al., 2014), werden die ABC1K als „atypische“ Proteinkinasen klassifiziert (Bayer et al., 2012; Lundquist et al., 2012). Für einzelne Vertreter der ABC1K-Familie wurde gezeigt, dass sie einen Einfluss auf den plastidären Tocopherol- und Lipidmetabolismus, aber auch licht- und hormonabhängige Signalwege haben (Lundquist et al., 2013; Martinis et al., 2014; Manara et al., 2015; Lohscheider et al., 2016; Manara et al., 2016; Yang et al., 2016).

Neben den zuvor beschriebenen Kinasen sind heute insgesamt 23 Proteine, für die eine Annotation als Proteinkinasen vorliegt und eine eindeutige Lokalisierung im Chloroplasten gezeigt werden konnte, bekannt (Bayer et al., 2012; Richter et al., 2016a). Basierend auf statistischen Erhebungen von Bayer et al. (2012) könnten jedoch bis zu 80 im Zellkern kodierte Proteinkinasen in die Plastiden importiert werden. Unterstützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass für in etwa 220-300 plastidäre Proteine Phosphopeptide identifiziert wurden (van Wijk et al., 2014; Baginsky, 2016). Die identifizierten Phosphoproteine sind am Kohlenstoff-, Lipid- und Aminosäuremetabolismus beteiligt (Baginsky und Gruissem, 2009). Auch Enzyme der TBS wurden als mögliche Ziele einer plastidären Proteinkinaseaktivität identifiziert (siehe folgender Abschnitt).



## Identifizierte Phosphoproteine der TBS

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war der Wissenstand zur Phosphorylierung von TBS Proteinen nur marginal ausgeprägt. Basierend auf Phosphoproteomanalysen mit (Plastiden-)Extrakten von *Arabidopsis* (Sugiyama et al., 2008; Lohrig et al., 2009; Reiland et al., 2009; Engelsberger und Schulze, 2012; Wang et al., 2013) konnten lediglich Hinweise auf eine mögliche Phosphorylierung von an der TBS beteiligten Proteinen abgeleitet werden (Baginsky und Gruissem, 2009). Daher leistet die vorliegende Schrift eine Pionierarbeit auf dem Gebiet der Phosphorylierung von TBS Proteinen.

**Tabelle I: Übersicht über die identifizierten Phosphopeptide von TBS Proteinen.**

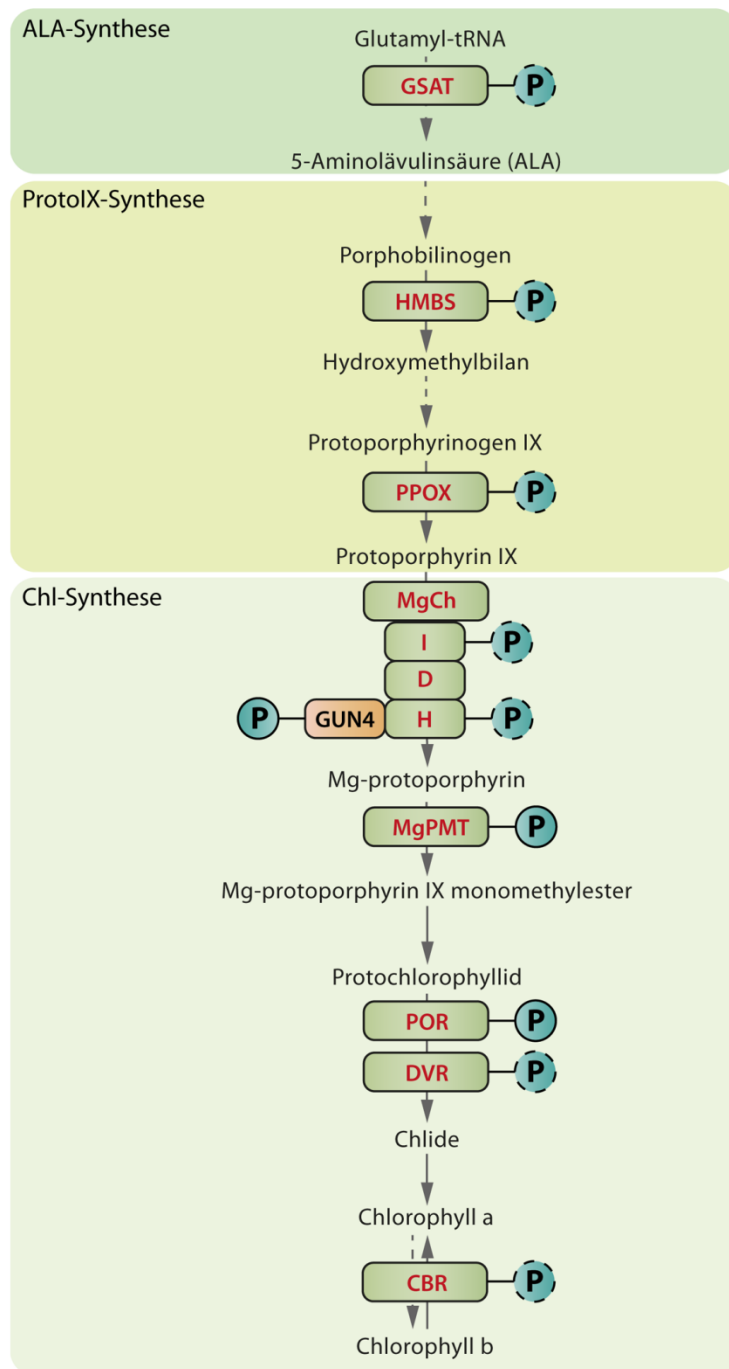
Dargestellt sind die Peptide der Proteine aus *Arabidopsis*. Sofern zugeordnet, sind die phosphorylierten Aminosäuren gekennzeichnet (pS und pT). Teilweise sind Peptide ohne zugehörige Referenz in der PhosPhat Datenbank (<http://phosphat.uni-hohenheim.de/db.html>) hinterlegt (PhosPhat4.0). Die Aussagen zur Konservierung beziehen sich auf die jeweiligen Isoformen aus *Arabidopsis*. Auszüge dieser Tabelle wurden in Brzezowski et al. (2015) veröffentlicht. n.i., nicht identifiziert. n.v., nicht veröffentlicht.

Protein	ATG	Phosphopeptid	Referenz	Bemerkung
GSA-2	AT3G48730	AG(pS)GVATLGLPDSPGVPK	Lohrig et al. 2009	konserviert in GSA-1
HMBS	AT5G08280	IL(pS)QPLADIGGK	Reiland et al. 2009	
UROD	AT2G40490	M(pS)ILQVSTSSLSSSTLLSI(pS)PR	Lohrig et al. 2009	Phosphorylierungsstelle befindet sich im Transitpeptid
PPOX-1	AT4G01690	LPKPQQGQ(pT)VGSR	Sugiyama et al. 2008	nicht konserviert in PPOX-2
		(pT)ECLIDGELKGFGQLHPR	PhosPhat4.0	
		MLIKPN(pS)TDPLK	PhosPhat4.0	
CHLH	AT5G13630	GSDKGIL(pS)DVELLK	Engelsberger und Schulze 2012	
		QLQDMYL(pS)RK	PhosPhat4.0	
CHLI-1	AT4G18480	VC(pS)ELNVDGLR	Reiland et al. 2009	nicht konserviert in CHLI-2
CHLI-2	AT5G45930	KDPLESMD(pS)GILVTEK	Sugiyama et al. 2008	konserviert in CHLI-1
GUN4	AT3G59400	VFKTNY(pS)F	Reiland et al. 2009	bestätigt in dieser Arbeit
CHLM	AT4G25080	n.i.	Richter und Grimm, n.v.	
PORA	AT5G54190	n.i.	Richter und Grimm, n.v.	
PORB	AT4G27440	GYV(pS)ETESGKR	Wang et al. 2013	konserviert in PORA und C
PORC	AT1G03630	n.i.	Richter und Grimm, n.v.	
DVR	AT5G18660	YYAAESMLILDPETGEYSEEK	Sugiyama et al. 2008	
CBR	AT4G13250	VENLEMVFSSVAVQIAR	Engelsberger und Schulze 2012	

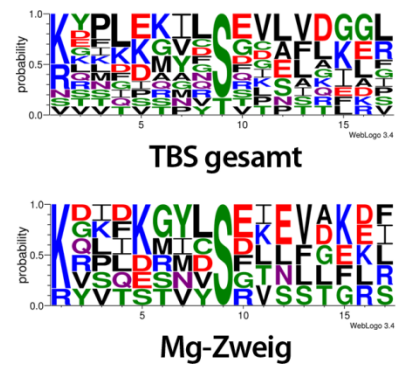
Die bis *dato* identifizierten Phosphopeptide der TBS Proteine sind in Tabelle I dargestellt. Mit Ausnahme des Phosphopeptides der UROD, welches sich im Transitpeptid befindet, können alle weiteren Phosphopeptide dem jeweils reifen Protein zugeordnet werden. Neben der GSAT, wurden auch für zwei Enzyme der ProtoIX-Synthese Phosphopeptide gefunden (Abbildung 1.13 A, HMBS und PPOX). In Ergänzung zu den per Massenspektrometrie identifizierten Phosphopeptiden, konnte für rekombinante PORA und C, sowie die MgPMT (CHLM) eine Phosphorylierung durch Pflanzenextrakte nachgewiesen werden (A. Richter, B. Grimm, nicht veröffentlicht) (Abbildung 1.13 A). Auch zwei Proteine aus den späten Schritten der Chl-Synthese scheinen phosphoryliert zu werden (DVR und

CBR). Die Phosphorylierbarkeit von H und I Untereinheit der MgCh, als auch von GUN4 (Abbildung 1.13 A), ist für die vorliegende Arbeit von besonderem Interesse. Zugleich war dies der Ausgangspunkt für die ausführliche Analyse der Phosphorylierung von GUN4.

A



B



**Abbildung 1.13: Übersicht zu identifizierten Phosphoproteinen der TBS (A) und Alignment der identifizierten Phosphopeptide aus *Arabidopsis* (B).**

(A) Diese Abbildung beschränkt sich auf die Darstellung von Enzymen der TBS, für die ein experimenteller Hinweis (gestrichelte Umrandung) oder konkrete Belege für eine Phosphorylierung vorliegen (durchgezogene Umrandungen). Weitere Informationen können Tabelle I entnommen werden. Enzyme sind in Grün, die Enzymabkürzungen in Rot dargestellt. Weitere Erläuterungen im Text. (B) Alignment der identifizierten Phosphopeptide der TBS Proteine aus *Arabidopsis* (Tabelle I). Die Farben spiegeln die chemischen Eigenschaften der Aminosäuren (AA) wieder: Rot, saure AA. Blau, basische AA. Grün, polare AA. Schwarz, hydrophobe AA. Lila, neutrale AA. Die Alignments wurden mit Hilfe der Weblogo3-Webseite erstellt (<http://weblogo.threeplusone.com/create.cgi>) und in Brzezowski et al. (2015) veröffentlicht.

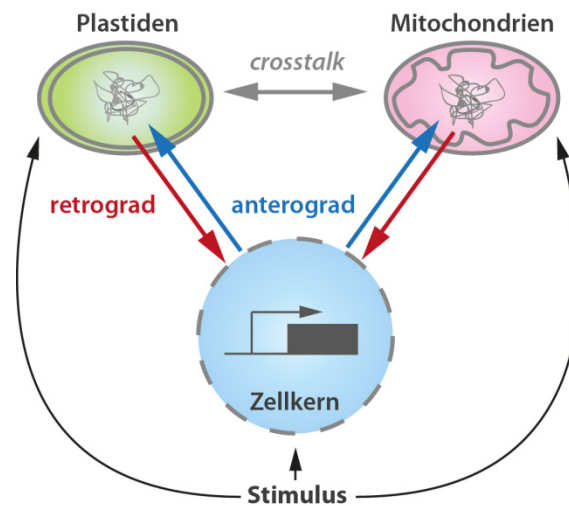
Aus einem Alignment der identifizierten Phosphopeptide kann geschlussfolgert werden, dass die Phosphorylierung an den TBS-Enzymen hauptsächlich an Serin (~80%) stattfindet. Außerdem lässt sich erkennen, dass es kein einheitliches Erkennungsmotiv für eine Proteinkinase zu geben scheint (Abbildung 1.13 B). Erst wenn das Alignment auf die Enzyme des Mg-Zweiges beschränkt wird, ergibt sich eine klare Präferenz für eine Serin-Phosphorylierung innerhalb eines Motives, das durch eine basische Aminosäure eingeleitet wird (Abbildung 1.13 B, K/R XXXXXXX S).

Aufgrund der wenigen Informationen, die zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit vorlagen, können an dieser Stelle noch keine Aussagen zur physiologischen Konsequenz der Phosphorylierung eines TBS Proteins getroffen werden. Da jedoch eine Vielzahl von möglichen Phosphoproteinen identifiziert wurden, ist davon auszugehen, dass die PTM der Phosphorylierung für die Aufrechterhaltung einer funktionellen TBS essentiell ist.

## 1.8 *Hello nucleus? The plastids are calling: retrograde Kommunikation zwischen Plastiden und Zellkern*

Plastiden und Mitochondrien haben ihren Ursprung in ehemals freilebenden Mikroorganismen. Diese wurden im Zuge einer Endosymbiose in eine (eukaryotische) Wirtszelle aufgenommen (Dyall et al., 2004; Hohmann-Marriott und Blankenship, 2011). Phylogenetische Analysen legen nahe, dass die Mitochondrien von  $\alpha$ -Proteobakterien, die Chloroplasten hingegen von einem mit den Cyanobakterien verwandten Einzeller abstammen. Diese Vorläufer waren mit einem vollständigen Satz genetischer Information ausgestattet, der es diesen Individuen ermöglicht(e), eine autonome Lebensweise zu führen. Im Laufe der 1,5 Milliarden Jahre währenden Evolution dieser Endosymbionten innerhalb ihrer Wirtszelle wurde der Großteil der genetischen Information in das Erbgut des Wirtes integriert. Daher kodieren ‚moderne‘ Chondrome und Plastome nur noch für einen Bruchteil der ehemals in den Vorläuferorganismen vorhandenen Proteine (hauptsächlich Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskette und der plastidären Photosynthese und Genexpression) (Andersson et al., 2003; Richly und Leister, 2004). Der verbleibende Teil der Proteine, die für die biochemischen Vorgänge in diesen Organellen gebraucht werden, muss im Zellkern transkribiert, im Cytosol translatiert und anschließend in die Organellen importiert werden. Schätzungen zu Folge werden mehrere tausend Proteine in die Plastiden von Pflanzen importiert (Abdallah et al., 2000; Leister, 2003).

Im Zuge der langfristigen Etablierung des Endosymbionten als fester Bestandteil des Organellenverbundes musste sich nicht nur die Genstruktur verändern (Anpassung von Promotoren, *splicing sites*, Faktoren die die Translation beeinflussen etc.) (Stegemann und Bock, 2006; Fuentes et al., 2012). Auch die Kontrolle der Expression der vormals in den Organellen kodierten Genprodukte musste sich an die räumliche Trennung zwischen Synthese- (Zellkern) und Nutzungsort (Organellen) anpassen. Um die korrekte Konzentration organellärer Proteine und damit die Organellenfunktion zu gewährleisten, mussten sich Mechanismen zur Koordinierung der Expression von Genprodukten, die in die Organellen importiert werden, entwickeln. Gleichzeitig finden in den Plastiden essentielle metabolische Reaktionen statt (u.a. Aminosäure-, Lipid-, Stärke-, Tetrapyrrol- und Hormonsynthese). In Abhängigkeit von biotischen (Pathogene) und abiotischen Faktoren (Licht, Temperatur, Wasserangebot) haben die Chloroplasten als Ort der Photosynthese einen Einfluss auf den gesamten zellulären Stoffwechsel (Chan et al., 2015). Die Chloroplasten fungieren als Sensor für die Anpassung des pflanzlichen Metabolismus an veränderliche Umweltbedingungen.



**Abbildung 1.14: Schema zu den intrazellulären Kommunikationswegen.**  
Weitere Erläuterungen im Text.

Je nach Ursprung des Stimulus und des Wirkungsortes der Antwort lassen sich Kommunikationswege definieren, die für die Koordinierung organellärer und nukleärer Genexpression notwendig sind (Abbildung 1.14). Die anterograde Kommunikation beschreibt den Weg vom Zellkern zu den Organellen. Im Rahmen dieser Kontrolle nehmen im Zellkern kodierte Genprodukte einen Einfluss auf die Prozesse in den Organellen. Die endo- und exogenen Faktoren zur Regulation dieser Gene haben bei der anterograden Kommunikation ihren Ursprung außerhalb der Organellen (z.B. die Aktivität von cytosolischen Photorezeptoren oder die im Zellkern kodierte Untereinheit der plastidären RNA-Polymerase (NEP)). Im umgekehrten Fall, der retrograden Kommunikation, nehmen Signale und Faktoren mit Ursprung in den Organellen einen Einfluss auf die nukleäre Expression von Genprodukten, die in den Organellen selbst oder in einem anderen Kompartiment benötigt werden (Abbildung 1.14). Bedingt durch die metabolische Abhängigkeit beider Organellen, muss auch ein interorganellärer Austausch zwischen Plastiden und Mitochondrien bestehen (Abbildung 1.14) (Pesaresi et al., 2007; Chan et al., 2015; Kleine und Leister, 2016). Auf diesen *crosstalk* und die retrograden Signale mit Ursprung in den Mitochondrien wird im Folgenden nicht näher eingegangen.

An dieser Stelle sei bereits darauf hingewiesen, dass der Term „retrograde Kommunikation“ kein singuläres Ereignis beschreibt. Vielmehr versucht dieser Begriff eine Vielzahl von Kommunikationswegen in einem Konzept zusammenzufassen: für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase ist der bilaterale kontinuierliche oder ereignisabhängige Austausch von Informationen zwischen den Chloroplasten (und auch Mitochondrien) und der nukleären/cytosolischen Genexpressionsmaschinerie unabdingbar. In der Literatur hat es sich durchgesetzt, die plastidären retrograden Signale hinsichtlich ihres Auftretens in der Entwicklung der Pflanze oder unter einer bestimmten (Stress-)Bedingung zu klassifizieren. Die sogenannten *biogenic signals* sind retrograde Signale, die während der Biogenese (Entwicklung) der Chloroplasten unter

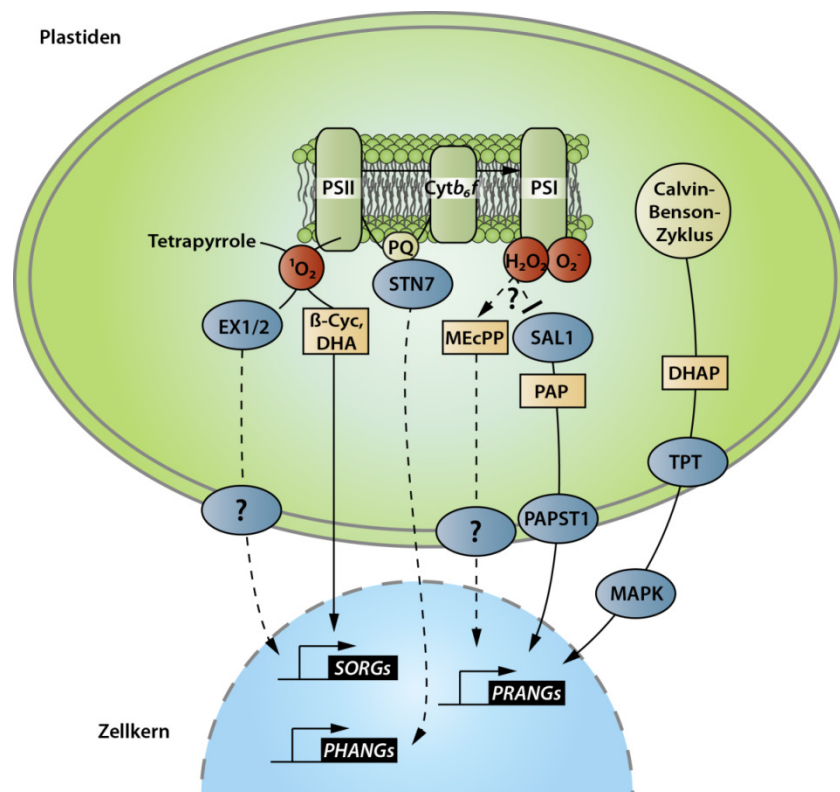
anderem für die Koordinierung der Expression von im Plastiden oder Zellkern kodierten Photosystem-Untereinheiten verantwortlich sind. Ist der funktionsfähige Chloroplast etabliert, übernimmt das sogenannte *operational signaling*. Diese retrograden Signale werden in Abhängigkeit von Stimuli, die einen Einfluss auf die Chloroplastenhomöostase haben (beispielsweise Lichtstress), von den ausdifferenzierten Chloroplasten ausgesendet (Pogson et al., 2008; Chan et al., 2015).

In den vergangenen Dekaden wurden eine Vielzahl von retrograden Signalen und deren physiologische Konsequenz identifiziert (Nott et al., 2006; Pogson et al., 2008; Woodson und Chory, 2008; Moller und Sweetlove, 2010; Kim et al., 2012; Chi et al., 2013; Terry und Smith, 2013; Larkin, 2014; Brzezowski et al., 2015; Chan et al., 2015; Chi et al., 2015; Singh et al., 2015; Kleine und Leister, 2016; Kmiecik et al., 2016). All diese retrograden Signale mit der notwendigen Fülle von Details darzustellen, ist im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Daher sollen im Folgenden die Grundprinzipien der bisher bekannten retrograden Signalwege anhand einzelner Beispiele illustriert werden.

### 1.8.1 *Operational signaling* – die plastidäre(n) Antwort(e)n auf Stress

Chloroplasten beherbergen die photosynthetisch aktiven Proteinkomplexe, deren Funktion und Aktivität auf der Lichtabsorption durch Photosynthesepigmente beruht. Wird die aufgenommene Energie nicht durch photochemisches und nicht-photochemisches Quenching ordnungsgemäß abgeleitet, steigt die Wahrscheinlichkeit zur Produktion von ROS (Abschnitt 1.2, S.21). Daher ist es nachvollziehbar, dass akute Störungen der photosynthetischen Elektronentransportkette, zum Beispiel unter Wassermangel oder Starklicht, zur Akkumulation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{O}_2^-$  (PSI) oder  $^1\text{O}_2$  (PSII) führen (Abbildung 1.15). Ein Ungleichgewicht in der plastidären Redox-Homöostase ist die Folge (Triantaphylides und Havaux, 2009; Moller und Sweetlove, 2010). Wenngleich die Mediatoren nicht bekannt sind, führt die plastidäre Akkumulation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zur Induktion von *PLASTID REDOX-ASSOCIATED GENES* (*PRANGs*) (Sewelam et al., 2014). Zusätzlich zu Wasserstoffperoxid, führt die Akkumulation eines Intermediates des plastidären Methylerythritolphosphat-Weges (MEP; Isoprenoidsynthese) nach Verwundung und Starklichtstress zu einer Induktion von *PRANGs*. Die Akkumulation von Methylerythritolcyclophosphat (MEcPP, Abbildung 1.15) korreliert mit einem Anstieg von Salicylsäure, erhöhter Resistenz gegenüber biotischem Stress und der Induktion einer HYDROXYPEROXID-LYASE, die an der Spaltung von Fettsäure-Hydroperoxiden beteiligt ist (Xiao et al., 2012). Auch die Akkumulation von plastidärem 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphat (PAP) nimmt einen Einfluss auf die Expression von *PRANGs* (Estavillo et al., 2011). Im Zuge der Akkumulation von ROS unter Trockenstress und Starklicht wird das PAP-konvertierende Enzyme SAL1 (Bisphosphat Nucleotidase) gehemmt und PAP akkumuliert (Abbildung 1.15). Nach dem spezifischen Export aus den Plastiden (ADENOSINE 3'-PHOSPHO 5'-PHOSPHOSULFATE TRANSPORTER 1, PAPST1) nimmt PAP,

vermittelt über weitere Faktoren, einen Einfluss auf die Expression von beispielsweise der ASCORBAT PEROXIDASE 2. Die stressinduzierte Akkumulation von MEcPP und PAP im Plastiden induziert somit eine zelluläre Antwort auf oxidativen Stress im Plastiden (Estavillo et al., 2011; Xiao et al., 2012; Xiao et al., 2013). Auch ein Intermediat des Calvin-Benson-Zyklus, das Di-hydroxyacetonphosphat (DHAP), ist für die unter Hochlicht induzierte Stressantwort notwendig (Vogel et al., 2014). DHAP wird durch einen Triosephosphat Translokator (TPT, Abbildung 1.15) in das Cytosol exportiert, wo es die Aktivität einer MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE 6 (MAPK6) beeinflusst. Die MAPK6 soll anschließend die Aktivität *PRANG*-spezifischer Transkriptionsfaktoren regulieren (Vogel et al., 2014).



**Abbildung 1.15: Retrograde Kommunikation zwischen Plastiden und Zellkern vermittelt durch das *operational signaling*.**

Erläuterungen zu den Signalwegen (Pfeile), den Signalmolekülen (Gelb), den involvierten Proteinen (Blau) und ROS (Rot) im Text. Einzelne Signalmoleküle können den Chloroplasten verlassen (durchgezogene Pfeile) und nehmen einen Einfluss auf *downstream* Komponenten der Signalkaskade. *SORGs*, *SINGLET OXYGEN-RESPONSIVE GENES*. *PRANGs*, *PLASTID REDOX-ASSOCIATED GENES*. *PHANGs*, *PHOTOSYNTHESIS-ASSOCIATED NUCLEAR GENES*. Die Abbildung wurde in Anlehnung an Chan et al. (2015) erstellt.

Neben den nukleären Genen, die durch die zuvor genannten plastidären Metabolite und ROS reguliert werden, lässt sich eine weitere Gruppe von stressinduzierten Genen definieren. Die sogenannten *SINGLET OXYGEN-RESPONSIVE GENES* (*SORGs*) werden spezifisch durch (plastidären) Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) induziert (Kim et al., 2008; Moller und Sweetlove, 2010; Ramel et al., 2012; Kim und Apel, 2013a; Havaux, 2014). Je nach Stärke der  $^1\text{O}_2$ -Akkumulation wird eine Akklimatisierungsantwort oder aber der programmierte Zelltod induziert. In Abhängigkeit der Quelle



des  $^1\text{O}_2$  innerhalb der Plastiden (PSII oder freie Tetrapyrrole) werden dabei zwei verschiedene Kommunikationswege und retrograde Signale induziert.  $^1\text{O}_2$ , das am PSII entsteht, oxidiert  $\beta$ -Carotin und führt zur Freisetzung der Spaltprodukte  $\beta$ -Cyclocitral ( $\beta$ -Cyc) und Dihydroactinidiolide (DHA). Diese beiden flüchtigen Substanzen regulieren die Expression von *SORGs* über einen bisher unbekannten Mechanismus (Abbildung 1.15). Der zweite Kommunikationsweg basiert auf der Bildung von  $^1\text{O}_2$  aus der Interaktion von molekularem Sauerstoff mit freien Tetrapyrrolen. Die *flu* Mutante akkumuliert in einer Dunkelphase freies Pchl<sub>a</sub>, welches innerhalb weniger Minuten nach der Belichtung die Bildung von  $^1\text{O}_2$  katalysiert. Als eine Konsequenz bilden *flu* Mutanten in kürzester Zeit Nekrosen aus und sterben schlussendlich ab (Meskauskiene et al., 2001; Kim et al., 2012). Wie gezeigt werden konnte, wird diese phänotypische Veränderung durch ein genetisches Programm induziert (programmierter Zelltod). Die  $^1\text{O}_2$ -abhängige Re-programmierung ist dabei unabhängig von der Oxidation von  $\beta$ -Carotin (siehe oben), bedarf jedoch zweier plastidärer Vermittler: EXECUTER (EX) 1 und 2 (Kim und Apel, 2013b; Chan et al., 2015) (Abbildung 1.15). Trotzdem eine *flu/ex* Doppelmutante weiterhin Pchl<sub>a</sub> und  $^1\text{O}_2$  akkumuliert, sterben diese Pflanzen unter photoperiodischen Anzuchtbedingungen nicht ab.

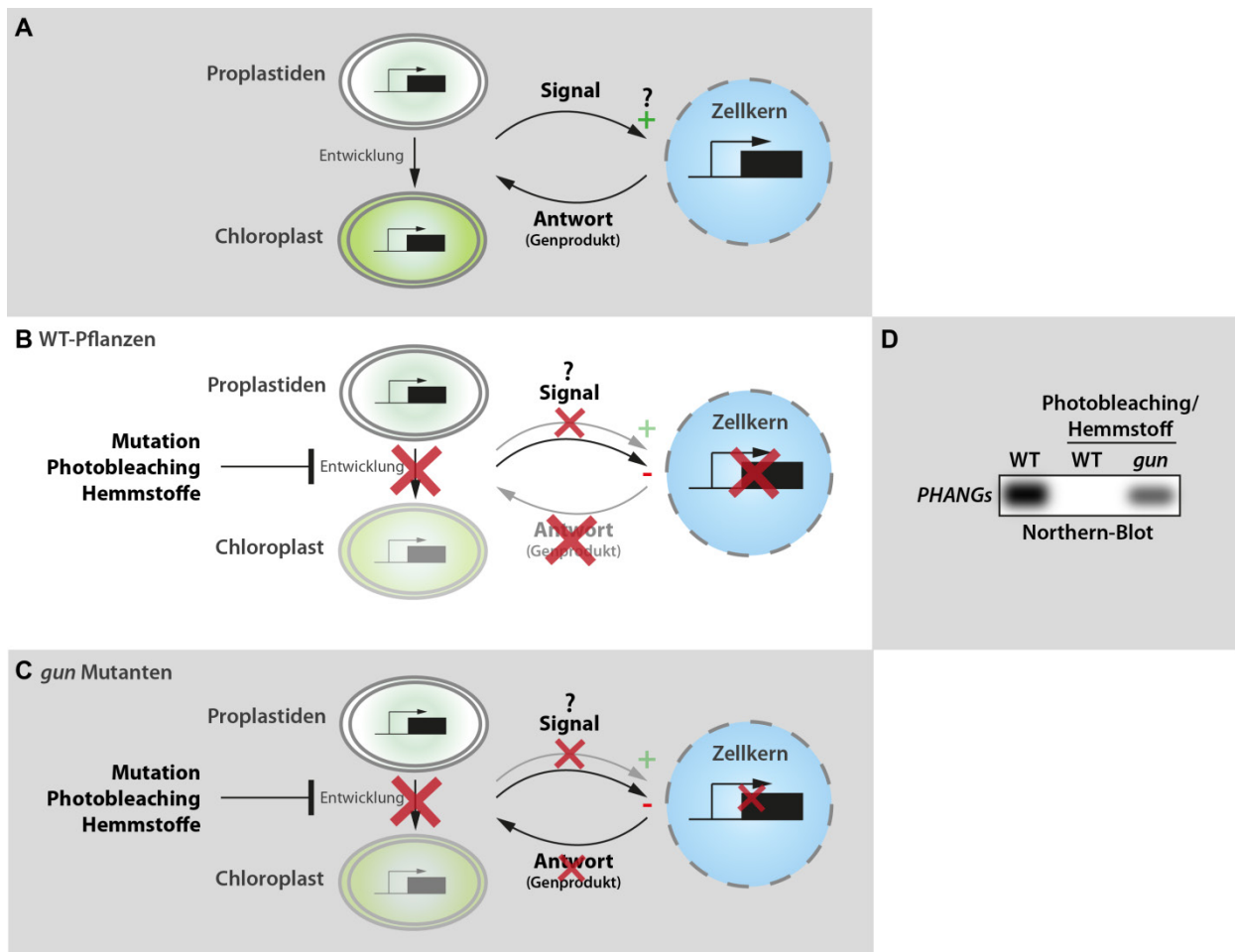
Die zuvor beschriebenen retrograden Signale und Kommunikationswege können als Antwort auf eine akute und drastische Störung der plastidären Prozesse verstanden werden. Insbesondere die stressinduzierte Akkumulation von ROS in den Plastiden veranlasst die Pflanze umgehend Mechanismen zu deren Detoxifizierung und zum Erhalt der zellulären Integrität einzuleiten. Um die Pflanze zu schützen kann dies in letzter Konsequenz auch zur Aufgabe ganzer Zellen und Gewebsverbände führen (programmierter Zelltod in der *flu* Mutante). In Ergänzung zu diesen Mechanismen kann sich die Pflanze jedoch auch auf moderate Veränderungen in der Lichtqualität und -quantität einstellen. Im Zuge einer unterschiedlichen Anregung der Photosysteme unter fluktuierenden Lichtbedingungen verändert sich der Redox-Status der gesamten photosynthetischen Elektronentransportkette (PET). Im Schwachlicht wird der Plastoquinon-Pool (PQ) oxidiert, während er unter höheren Lichtintensitäten vorrangig reduziert vorliegt. Diese Veränderung des PQ-Pools induziert einerseits den zuvor beschriebenen post-translationalen Mechanismus des *state transition* durch die STN7. Andererseits konnte gezeigt werden, dass sich das Transkriptionsprofil von *Arabidopsis* in Anpassung an unterschiedliche Lichtbedingungen (hauptsächlich Lichtqualität) verändert. Die Wahrnehmung des Ungleichgewichtes innerhalb der PET könnte durch die STN7 erfolgen und über bisher unbekannte Komponenten an den Zellkern vermittelt werden (Fey et al., 2005; Bräutigam et al., 2009). Die auf diesem retrograden Signalweg angesteuerten Zielgene gehören hauptsächlich zur Gruppe der *PHOTOSYNTHESIS-ASSOCIATED GENES* (*PHANGs*), die, neben anderen, im Zellkern kodierte Untereinheiten der PET umfasst (Bräutigam et al., 2009) (Abbildung 1.15). Interessanterweise vermittelt der Redox-Status des PQ-Pools eine weitere Ebene der

Genexpressionskontrolle im Zellkern. Genetische und biochemische Studien konnten zeigen, dass nukleäre Transkripte in Abhängigkeit des Redox-Status des PQ-Pools ein alternatives Splicing erfahren (Petrillo et al., 2014).

Neben dem Einfluss auf das Splicing, werden die retrograden Signale des *operational signaling* durch spezifische Transkriptionsfaktoren in eine transkriptionelle Antwort übersetzt (zusammengefasst in Kmiecik et al. (2016)).

### **1.8.2 Biogenic signaling – alles hört auf die Plastiden!**

Zusätzlich zur Herausforderung, die zelluläre Integrität unter Stressbedingungen durch das *operational signaling* zu gewährleisten, gibt es einen besonders kritischen Punkt in der Entwicklung einer Pflanze, der einer Kontrolle der zellulären Vorgänge bedarf. Während der lichtabhängigen Entwicklung müssen sich die in den Kotyledonen angelegten Proplastiden zu Chloroplasten ausdifferenzieren. Dabei ist insbesondere der Aufbau der PET für die Ausbildung des photoautotrophen Metabolismus essentiell. Der Umstand, dass Teile der PET-Untereinheiten in den Plastiden und ein weiterer Teil im Zellkern kodiert sind, lässt eine koordinierte Expression dieser Genprodukte während der Entwicklung der Chloroplasten notwendig werden (Abbildung 1.16). Auch die Transkription weiterer (plastiden-lokalisierter) Proteine muss an den Entwicklungszustand der Plastiden gekoppelt werden. Ohne funktionelle Chloroplasten ist die Transkription und Translation von (in Plastiden lokalisierten) Proteinen eine Verschwendung von Ressourcen. Daher muss der Entwicklungszustand der Plastiden wahrgenommen und an die nukleäre Genexpressionsmaschinerie kommuniziert werden. Die Tatsache, dass der als *biogenic signaling* bezeichnete retrograde Signalweg nur im kleinen Zeitfenster der Chloroplastenentwicklung während der Keimung eine Rolle spielt, ist ein klares Abgrenzungsmerkmal dem *operational signaling* gegenüber (Oelmüller et al., 1986; Pogson et al., 2008). Auch ist die im Rahmen des *biogenic signaling* ausgelöste transkriptionelle Antwort nicht kongruent mit der des *operational signaling* (Pogson et al., 2008; Chan et al., 2015).



**Abbildung 1.16: Biogenic signaling während der Entwicklung von Chloroplasten.**

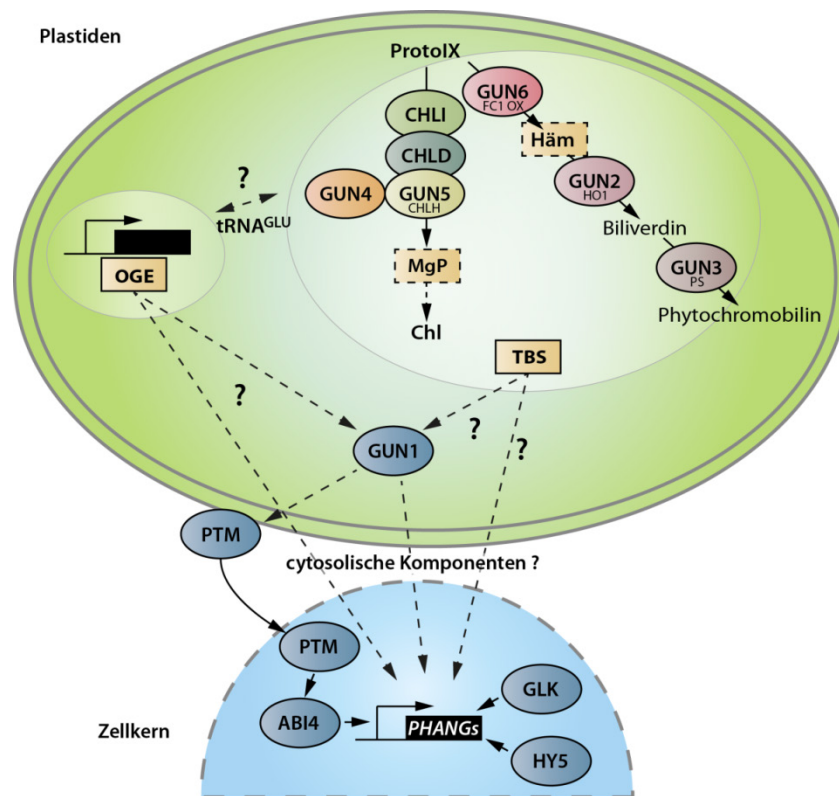
(A) Ohne Störung der Chloroplastenbiogenese koordinieren plastidäre Vorgänge die Expression nukleärer Genprodukte. (B) Wird die Plastidenentwicklung durch einen Stimulus (zum Beispiel Norflurazon-Behandlung) gestört, stellen WT-Pflanzen die Expression von *PHANGs* ein. (C) Als Folge der Mutation einer Komponente des retrograden Signalweges, zum Beispiel in den *genomes uncoupled* (*gun*) Mutanten, kann der plastidäre Zustand nur noch eingeschränkt an die nukleäre Genexpressionsmaschinerie kommuniziert werden. Wenngleich reduziert, akkumulieren die *gun* Mutanten weiterhin *PHANGs* (D, *in silico* Northern-Blot). Weitere Erläuterungen im Text.

Wenngleich die zu Grunde liegenden Signale und Mechanismen des *biogenic signaling* noch Gegenstand aktueller Diskussionen sind (siehe unten), haben diese einen Einfluss auf die Kernexpression während der Biogenese der Chloroplasten. Wird der Prozess der Chloroplastenentwicklung gestört, kommt die nukleäre Genexpression von beispielsweise *PHANGs* in WT-Pflanzen zum Erliegen (Abbildung 1.16). Obwohl die Plastidenentwicklung durch äußere Einflüsse gleichermaßen gestört wird, akkumulieren Mutanten des *biogenic signaling* (zum Beispiel die *genomes uncoupled* (*gun*) Mutanten, siehe unten) weiterhin nukleäre *PHANGs* (Abbildung 1.16). Stellvertretend für andere, hat sich in der Literatur die Analyse von folgenden *PHANGs* etabliert: *PLASTOCYANIN* (*PC*), *RUBISCO SMALL SUBUNIT* (*RBCS*), *CHLOROPLAST PROTEIN 12* (*CP12*), *CARBONIC ANHYDRASE 1* (*CA1*) und *LHCB(1.2)*. Tatsächlich betrifft die GUN-abhängige retrograde Kontrolle der Kerngenexpression fast alle Untereinheiten des Photosyntheseapparates und der Lichtsammelkomplexe (Page et al., 2016). Fraglich ist, ob von den in ihrer Entwicklung gehemmten

Chloroplasten ein negatives Signal ausgeht, oder ob das Ausbleiben eines positiven Signals zur Repression der Genexpression führt (Abbildung 1.16) (Woodson und Chory, 2008; Terry und Smith, 2013; Chan et al., 2015).

Es wurde bereits früh erkannt, dass die Plastidenentwicklung die Kontrolle über die nukleäre Genexpression hat (Bradbeer et al., 1979; Hess et al., 1994). Die als *albostrians* bezeichneten Mutanten von Gerste sind durch weiße Blattbereiche mit undifferenzierten Chloroplasten, die frei von Ribosomen sind, gekennzeichnet (Siemenroth et al., 1981; Emanuel et al., 2004). Innerhalb der weißen Bereiche ist die Expression von zellkernkodierten und plastiden-lokalisierten Proteinen, wie zum Beispiel Vertreter der LHC-Familie oder die kleine Untereinheit der RIBULOSE-1,5-BISPHOSPHAT CARBOXYLASE/ OXYGENASE (RBCS), vermindert (Hess et al., 1994). Auch in Mutanten mit Störungen in der plastidären Carotinoid-Biosynthese wurde eine Repression von zellkernkodierten Genen beobachtet. Als Folge reduzierter Carotinoid-Gehalte bleichen diese Pflanzen aus (fehlende Photoprotektion), stellen ihr Wachstum ein und akkumulieren nur reduzierte Mengen von *PHANGs* (Mayfield und Taylor, 1984; Avendano-Vazquez et al., 2014). Dieser Befund wird durch die Applikation eines Hemmstoffes der Carotinoid-Biosynthese (Norflurazon (NF)) unterstützt. NF inhibiert die plastidäre PHYTOEN DESATURASE und führt zum Ausbleichen der Pflanzen. Ausgelöst durch die zeitgleiche Hemmung der Plastidenentwicklung, führt auch die Anwendung von NF zur Verminderung der Expression von im Zellkern kodierten *PHANGs* (Oelmüller et al., 1986; Oelmüller und Mohr, 1986; Susek et al., 1993).

Im Zuge weiterer Analysen wurde deutlich, dass die Plastiden die Quelle für zwei unterschiedliche Signale im Rahmen des *biogenic signaling* sind. Unter Einsatz von spezifischen Hemmstoffen für Komponenten der organellären Genexpression (OGE) und Mutanten-Analysen konnte gezeigt werden, dass die plastidäre OGE die Quelle für ein retrogrades Signal ist. Gleichzeitig existiert ein retrograder Kommunikationsweg ausgehend von der TBS (Abbildung 1.17).



**Abbildung 1.17: Übersicht zu den identifizierten Signalen und Komponenten des *biogenic signaling*.**

Als Quelle für Signale des *biogenic signaling* wurden die organelläre Genexpression (OGE) und Tetrapyrrolbiosynthese (TBS) identifiziert (Gelb). Die möglichen retrograden Signalmoleküle der TBS sind durch unterbrochene Linien eingefasst. Die involvierten Proteinfaktoren sind als farbige Ovale dargestellt. Im Zellkern sind Transkriptionsfaktoren, die an der Umsetzung eines retrograden Signals in eine Transkriptionsantwort beteiligt sind, aufgeführt. Fragezeichen deuten auf postulierte Signal- und Übertragungswege. *PHANGs*, *PHOTOSYNTHESIS-ASSOCIATED NUCLEAR GENES*. FC1 OX (GUN6), FC1 Überexpresser. Weitere Erläuterungen im Text.

### Die organelläre Genexpression (OGE) als Quelle für ein retrogrades Signal

Werden Pflanzen mit Chloramphenicol, Lincomycin und Erythromycin (Inhibition organellärer Translation) oder Nalidixinsäure (Hemmung plastidärer DNA-Replikation und Transkription) behandelt, stellen diese ihr Wachstum und die Expression von plastidären und nukleären *PHANGs* ein (Oelmüller et al., 1986; Gray et al., 1995; Sullivan und Gray, 1999). Interessanterweise zeigte sich, dass das von der OGE ausgehende retrograde Signal unabhängig von der Anwesenheit von Licht ist. Mutanten aus Erbse (*lip1*) und *Arabidopsis* (*cop1-4*), die einen Defekt in der Photomorphogenese zeigen, exprimieren erhöhte Mengen von nukleären *PHANGs* in der Dunkelheit im Vergleich zum jeweiligen WT. Diese Expression kann durch Lincomycin reprimiert werden (Sullivan und Gray, 1999). Folglich ist das durch die Inhibition der OGE ausgesendete retrograde Signal in der Lage, die Kerngenexpression in der Dunkelheit zu beeinflussen. Zusätzlich wurde in *knockdown* Mutanten für eine PROLYL-tRNA SYNTHETASE1 (*prors*), die für die organelläre Translation notwendig ist, eine lichtunabhängige Reduktion der *PHANG*-Expression beobachtet (Pesaresi et al., 2006). Auch die Transkription, als Teil der OGE, scheint einen direkten Einfluss auf die OGE-abhängige retrograde Kommunikation zu haben. Der *knockout* zweier plastidärer Sigmafaktoren (SIG2 und SIG6) führt nicht

nur zur verminderten Akkumulation von plastidenkodierten Genprodukten, sondern auch zur Abnahme der *PHANG*-Expression in jungen Keimlingen (Woodson et al., 2012). Das erste Substrat der plastidären TBS ist eine plastidenkodierte tRNA<sup>GLU</sup>, deren Expression durch SIG2 und SIG6 gesteuert wird. Daher ist es nachvollziehbar, dass die *sig2* und *sig6* Mutanten einen limitierten Fluss von Intermediaten innerhalb der TBS und einen chlorotischen Phänotyp zeigen (Woodson et al., 2012). Die *sig2* spezifischen Beobachtungen können durch die Fütterung von ALA teilweise aufgehoben werden, was wiederum auf einen Zusammenhang zwischen dem OGE- und TBS-spezifischen retrograden Signal schließen lässt. Retrograde Kommunikation ausgelöst durch OGE und TBS könnte folglich über die Verfügbarkeit der tRNA<sup>GLU</sup> verbunden sein (Abbildung 1.17).

Den Ausführungen und Interpretationen von Woodson et al. (2012) folgend, kann der Effekt der SIG2 und 6-Defizienz durch die Einführung einer weiteren Mutation, *gun1* (siehe unten), teilweise aufgehoben werden. In *gun1/sig2* und *gun1/sig6* Mutanten ist die *PHANG* Expression im Vergleich zur jeweiligen Einzelmutante (wieder) erhöht. Damit wäre GENOMES UNCOUPLED 1 (GUN1) eine Komponente, die die Signalweitergabe *downstream* der OGE ermöglicht (Abbildung 1.17). GUN1 ist ein *pentatricopeptid repeat* (PPR)-Protein, das in einem Screen nach Mutanten mit einem Defekt in der plastidären retrograden Kommunikation identifiziert wurde (Susek et al., 1993; Koussevitzky et al., 2007). Im Gegensatz zum WT zeigen die identifizierten *gun* Mutanten eine De-repression der *PHANG* Expression unter Bedingungen, die zur Inhibierung der Chloroplastenentwicklung führen (zum Beispiel Norflurazon-Behandlung, siehe folgender Abschnitt, Abbildung 1.16). Neben GUN1 kodieren pflanzliche Genome für hunderte PPR-Proteine, die an der Reifung und Translation organellärer RNAs beteiligt sind (Schmitz-Linneweber und Small, 2008). Zusammen mit einer *small mutS-related* (SMR)-Domäne vermitteln die PPR-Motive die Interaktion mit Nukleinsäuren. Wenngleich für GUN1 eine Bindung an DNA und die Co-lokalisierung und Interaktion mit Faktoren der plastidären Transkriptionsmaschinerie gezeigt wurde (Koussevitzky et al., 2007; Colombo et al., 2016), fehlt bis heute der Beweis eines funktionellen Zusammenhangs zwischen Nukleinsäurebindung und dem GUN1-abhängigen retrograden Signal. Im Gegensatz zu den anderen *gun* Mutanten wird die *PHANG*-Expression in *gun1*, neben NF, ebenfalls durch den OGE-spezifischen Hemmstoff Lincomycin vom Zustand der Plastiden entkoppelt (Susek et al., 1993; Koussevitzky et al., 2007). Die sich daraus ergebende Sonderstellung innerhalb der bisher identifizierten GUN-Proteine, ist zugleich ein Beleg dafür, dass GUN1 in der OGE-abhängigen Kommunikation involviert ist (Nott et al., 2006).

In einer Veröffentlichung zu GUN1 wurde ein Transkriptionsfaktor (TF) beschrieben, der den GUN1-abhängigen Stimulus aus den Plastiden in eine Aktion im Zellkern übersetzt. Innerhalb der Promotorsequenzen der de-regulierten Gene in *gun1* (und *gun5*) wurde ein ACGT-Motiv identifiziert,

welches Teil der lichtabhängigen G-Box (CACGTG) und eines Abscisinsäure (ABA) *response element* (ABRE) ist (Koussevitzky et al., 2007). Wie sich herausstellte, bindet der TF ABA-INSENSITIVE 4 (ABI4, Leon et al. (2012); Wind et al. (2013)) den Promotor von *PHANGs* (z.B. *LHCB1.2*) an diesem Motiv und kann die GUN1-abhängige Regulation der Kerngenexpression beeinflussen (Acevedo-Hernandez et al., 2005; Koussevitzky et al., 2007). Eine *abi4* Mutante zeigt ebenfalls einen *gun* Phänotyp nach Lincomycin- (OGE-spezifisch) und NF-Behandlung (TBS-spezifisch). Die Überexpression von ABI4 reprimiert die Lincomycin-abhängige Entkopplung der Kerngenexpression in *gun1*, sodass mehr ABI4 weniger *PHANG*-Expression zur Folge hat. Eine *gun1/abi4* Doppelmutante zeigt dieselbe Stärke der Entkopplung wie die Einzelmutanten. Gleichzeitig überlappen sich die Transkriptionsprofile von *gun1* und *abi4* zu einem großen Teil. Dies wurde als Beleg dafür angesehen, dass GUN1 und ABI4 im selben retrograden Kommunikationsweg arbeiten (Abbildung 1.17) (Koussevitzky et al., 2007). Offen blieb zu diesem Zeitpunkt, wie das von GUN1 ausgehende und durch ABI4 übersetzte Signal die Passage zwischen Plastiden und Zellkern überwinden kann. Diese Lücke wurde mit der Identifizierung eines mobilen TF geschlossen (Sun et al., 2011). Im Zuge der Induktion eines retrograden Signals verlagert ein PLANT HOMEODOMAIN (PHD) TF (PTM, PHD TYPE TRANSCRIPTION FACTOR WITH TRANSMEMBRANE DOMAINS) seine subzelluläre Lokalisation von der Hüllmembran der Chloroplasten hin zum Zellkern (Abbildung 1.17). Dort aktiviert der PTM die Transkription von *ABI4*, welcher wiederum die Expression der *PHANGs* reprimiert (Sun et al., 2011). Die Analyse der Doppelmutanten *gun1/ptm* und *abi4/ptm* führten ebenfalls zu dem Schluss, dass GUN1, PTM und ABI4 gemeinsam an der Vermittlung des OGE-abhängigen Signals beteiligt sind.

### Die TBS als Quelle für ein retrogrades Signal: die *genomes uncoupled* Mutanten 2-6

Wie im vorhergehenden Abschnitt bereits angedeutet, wurden in einem Experiment zur Identifizierung von Komponenten des retrograden Signalweges neben *gun1* weitere *gun* Mutanten isoliert (Susek et al., 1993; Mochizuki et al., 2001). Es sollte sich herausstellen, dass die als *gun2-5* benannten Mutanten für punktmutierte Proteine kodieren, die an der plastidären TBS beteiligt sind (Susek et al., 1993; Vinti et al., 2000; Mochizuki et al., 2001; Larkin et al., 2003). Während *gun2* und *gun3* für die HÄMOXYGENASE (HO/*hy1*) beziehungsweise die PHYTOCHROMOBILIN SYNTHASE (PS/*hy2*) kodieren, ist die *gun5* Mutante in der MgCh H Untereinheit und *gun4* im Stimulator der MgCh (GUN4) mutiert (Abbildung 1.17). Diesen Mutanten ist gemein, dass sie unter Einsatz von Norflurazon, aber auch unter Starklichtbedingungen, die nukleäre *PHANG*-Expression vom plastidären Status entkoppeln (Mochizuki et al., 2001; Strand et al., 2003; Koussevitzky et al., 2007). Folglich exprimieren diese Mutanten unter den genannten Bedingungen mehr *PHANGs* als eine WT-Kontrolle (Abbildung 1.16). Im Gegensatz zu *gun1* kann die De-repression der *PHANGs* in *gun5* lediglich durch Hemmstoffe der Carotinoidbiosynthese oder Starklicht, nicht jedoch durch Inhibition der OGE (Lincomycin) forciert werden (Koussevitzky et al., 2007). Dieser Befund und die Tatsache,

dass die *gun2-5* Mutanten eine deutliche Beeinträchtigung der TBS aufweisen (Vinti et al., 2000; Mochizuki et al., 2001; Larkin et al., 2003; Peter und Grimm, 2009), führte zur Definition eines von der OGE-unabhängigen retrograden Signalweges ausgehend von der TBS (Abbildung 1.17) (Vinti et al., 2000; Mochizuki et al., 2001; Strand et al., 2003; Strand, 2004; Woodson und Chory, 2008). Interessanterweise scheint es dennoch eine Überlappung des OGE und TBS-Signales zu geben. Zum einen führt die Behandlung mit Lincomycin oder der *knockout* von *SIG2/6* (OGE-spezifisch) annähernd zur selben Transkriptionsveränderung wie sie unter NF-Behandlung (TBS-spezifisch) zu beobachten ist (Woodson et al., 2012). Zum anderen ist die Stärke der De-repression der *PHANGs* in *gun1/gun5* Doppelmutanten vergleichbar mit den Einzelmutanten. Auch der Befund, dass das Transkriptionsprofil von *gun1* und *gun5* nach NF-Behandlung nahezu identisch ist, ist ein Beleg für die Überlappung des OGE- und TBS-spezifischen retrograden Signalweges (Koussevitzky et al., 2007). Möglicherweise ist der Ursprung des Signals verschieden, wird jedoch durch GUN1 in eine gemeinsame Antwort übersetzt (Abbildung 1.17).

Zahlreiche Versuche das von der TBS ausgehende Signalmolekül näher zu charakterisieren, haben umfangreiche, jedoch teilweise widersprüchliche Studien hervorgebracht. Mit der Frage nach dem TBS-spezifischen Signal musste zunächst geklärt werden, welche Proteine/Enzyme der TBS (neben den GUN) einen Einfluss auf die retrograde Kommunikation haben. Zusätzlich zur H Untereinheit der MgCh (*gun5*), wurde auch für Mutanten der D Untereinheit (in Gerste, Gadjieva et al. (2005)) und den I Untereinheiten (in *Arabidopsis*, Huang und Li (2009)) ein *gun* Phänotyp beobachtet. Mutanten mit reduzierter Expression anderer Proteine/Enzyme der TBS zeigen keine De-repression der *PHANGs* nach NF-Behandlung und sind folglich keine *gun* Mutanten (Strand et al. (2003); Gadjieva et al. (2005); Voigt et al. (2010); Woodson et al. (2011); A. Richter und B. Grimm, nicht veröffentlicht). Die Analyse der *gun4* und *gun5* Mutanten, sowie biochemische Analysen mit Hemmstoffen und Intermediaten der TBS zeigten, dass das Produkt der MgCh-Reaktion (MgP) als spezifisches Signal fungieren könnte (Mochizuki et al., 2001; Strand et al., 2003; Koussevitzky et al., 2007). Der formulierten Theorie folgend, soll im Zuge der NF-Behandlung in WT-Pflanzen MgP akkumulieren und die Repression der *PHANGs* vermitteln. Aufgrund der beeinträchtigten TBS in den *gun2-5* Mutanten ist die MgP-Akkumulation und folglich die Repression der *PHANGs* vermindert. MgP wäre somit ein reprimierendes Signal, welches unter Bedingungen, die die Plastidenentwicklung unterbinden, ausgesendet wird (Strand, 2004; Nott et al., 2006; Woodson und Chory, 2008). Nur kurze Zeit später wurde diese Theorie jedoch widerlegt. In zwei Artikel aus dem Jahr 2008 wurde gezeigt, dass der Gehalt von (Mg-)Porphyrinen unter keiner der analysierten Bedingungen mit der Expression der *PHANGs* korreliert und MgP daher nicht das Signalmolekül der TBS-vermittelten retrograden Kontrolle der *PHANGs* sein kann (Mochizuki et al., 2008; Moulin et al., 2008). Erst mit der



Identifikation der *gun6* Mutante im Jahr 2011, wurde der Diskurs über ein mögliches TBS-Signal wiederbelebt (Woodson et al., 2011; Chi et al., 2013; Terry und Smith, 2013; Chan et al., 2015; Chi et al., 2015). Eine Überexpressionslinie der plastidären FC1 (*gun6*), nicht aber der FC2, zeigt eine für die *gun* Mutanten charakteristische De-repression der *PHANGs* nach NF-Behandlung (Woodson et al., 2011). Die FC1 und 2 katalysieren die Bildung von Häm aus ProtoIX (Abbildung 1.17), wobei die FC2 die für die plastidäre Hämsynthese in grünem Gewebe wichtigere Isoform ist (Scharfenberg et al., 2015). Ohne konkreten experimentellen Beleg soll die Überexpression von FC1 zu erhöhten Häm-Gehalten führen (Woodson et al., 2011). Das durch die FC1, nicht aber durch FC2 gebildetes Häm, soll für die Aufrechterhaltung der *PHANG*-Expression in der *gun6* Mutante unter NF-Behandlung verantwortlich sein.

Interessanterweise zeigt eine *fc1/gun5* Mutante (*knockdown* für FC1) eine reduzierte Expression der *PHANGs* im Vergleich zur *gun5* Mutante (Woodson et al., 2011). Folglich konnte die „Häm-Theorie“ auch auf die *gun2-5* Mutanten ausgeweitet werden. Bedingt durch den reduzierten Abbau von Häm in den *gun2* und *gun3* Mutanten, sowie durch eine vermeintliche Umverteilung von ProtoIX in den Häm-Syntheseweg der *gun4* und *gun5* Mutanten, soll ein erhöhter Häm-Gehalt den retrograden Signalweg beeinflussen. Da in allen Mutanten keine Veränderungen im (nicht-kovalent gebundenen) Häm gemessen wurden, wurde ein nicht näher bestimmbarer „regulatorischer Häm-Pool“ definiert. Überträgt man die Existenz eines solchen Häm-Pools auf die Chloroplastenentwicklung in WT-Pflanzen, könnte der folgende, TBS-spezifische retrograde Signalweg beschrieben werden. Ein sich entwickelnder Plastid synthetisiert Häm, welches als Signal für die Vitalität der Plastiden durch die nukleäre Genexpressionsmaschinerie interpretiert wird. Kommt es zur Störung der Plastidenentwicklung wird die Häm-Synthese eingestellt und folglich das positive Signal nicht mehr ausgesendet (Abbildung 1.16, Terry und Smith (2013); Chan et al. (2015)). Wird die Existenz eines regulatorischen Häm-Pools akzeptiert, würde dieses positive Signal weiterhin oder im größeren Umfang durch die Plastiden der *gun2-6* Mutanten ausgesendet werden. Folglich würde die *PHANG*-Expression in diesen Mutanten weniger stark reprimiert. Aufgrund der Tatsache, dass Häm auch als wichtiger Co-faktor nicht-plastidärer Proteine dient, scheint die Voraussetzung für die Übermittlung des Signales durch den Export von Häm gegeben zu sein. Häm hat auch einen Einfluss auf die Kerngenexpression in *Chlamydomonas* (von Gromoff et al., 2008).

Die Suche nach Gemeinsamkeiten und Unterschieden zwischen *gun* und anderen TBS-Mutanten, war und ist eine der größten Herausforderung für die Aufklärung der molekularen Vorgänge der retrograden Kommunikation aus den Plastiden. Aus der Literaturrecherche und den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten konnte eine interessante Korrelation abgeleitet werden. Im Vergleich zu nicht-*gun* Mutanten sind *gun1*, *gun4* und *gun5* Mutanten durch eine verminderte

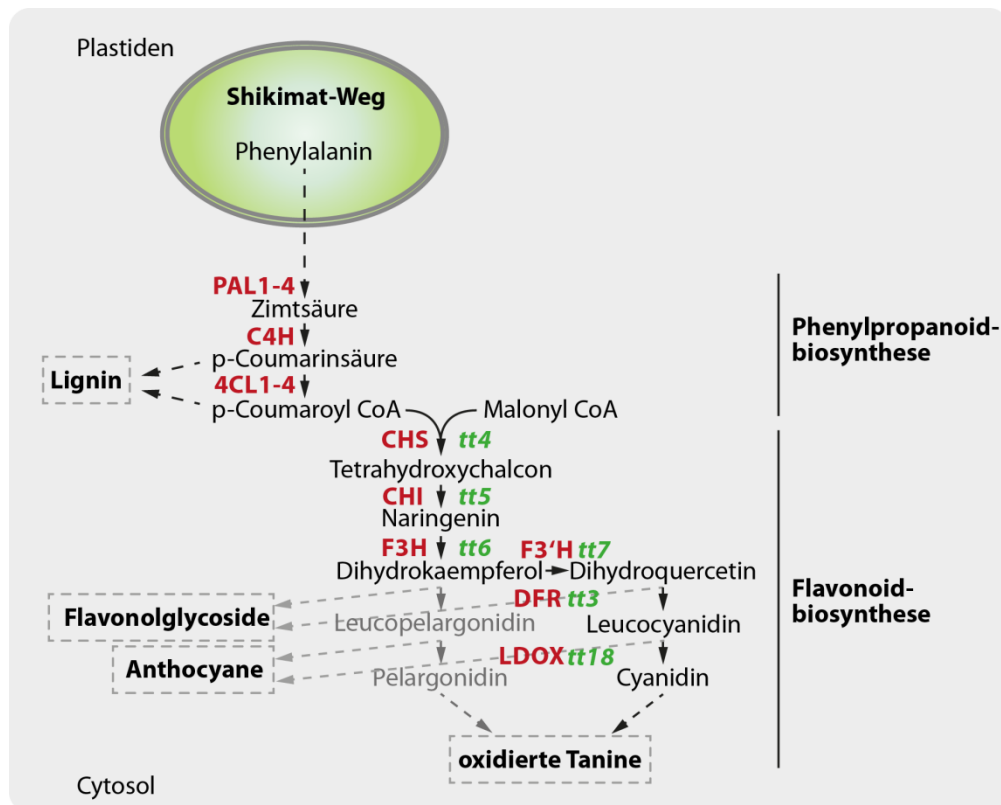
Fähigkeit zur Akkumulation von Anthocyanen gekennzeichnet (diese Arbeit und Cottage et al. (2010); Voigt et al. (2010)). Anthocyane sind Endprodukte der cytosolischen Phenylpropanoid- und Flavonoidbiosynthese. Daher soll im Folgenden ein kurzer Einblick in diese Stoffwechselwege gegeben werden.

## **1.9 Die Synthese von Phenylpropanoiden und Flavonoiden**

### **1.9.1 Die Biosynthesewege**

Flavonoide finden sich in allen Pflanzen und sind die wohl am besten analysierte Gruppe pflanzlicher Sekundärmetabolite (Saito et al., 2013; Passeri et al., 2016). Als solche haben sie unterschiedliche biologische Aktivitäten in Pflanzen, werden aber auch als antioxidativer Nahrungsmittelzusatz gehandelt (Halliwell et al., 2005). Sie fungieren als Pigmente für die Färbung von Früchten und Blüten (Tanaka et al., 2008), die UV-B und Photoprotektion (Agati und Tattini, 2010; Agati et al., 2013) oder sind an der Abwehr von Pathogenen beteiligt (War et al., 2012). Im Wesentlichen lassen sich die Produkte der Flavonoidbiosynthese in die Flavonolglycoside, oxidierte Tannine (Pro-Anthocyane) und Anthocyane unterteilen (Abbildung 1.18). Intensive Untersuchungen zu diesen Endprodukten zeigen, dass ihre Synthese unter veränderten biotischen (Pathogene) und abiotischen Faktoren (Licht, Temperatur, Nährstoffe) unterschiedlich reguliert wird (Zhao und Tao, 2015; Commisso et al., 2016). So akkumulieren Pflanzen im Zuge eines Nährstoffmangels (Phosphat oder Stickstoff), Temperatur- und Lichtstress sichtbare Mengen von Anthocyanen in den Blättern (Diaz et al., 2006; Huang et al., 2010). Daher wird eine Anthocyanakkumulation häufig als Stressmarker verwendet. Die Flavonoide/Anthocyane werden ausgehend von einer plastidären Vorstufe im Cytosol synthetisiert und anschließend in die Vakuole transportiert. Dort nehmen sie entsprechend ihrer chemischen Struktur und des pH-Wertes eine unterschiedliche Färbung an (Passeri et al., 2016). Flavonoid-Derivate sind, neben Chl und Carotinoiden, die farbbestimmenden Pigmente pflanzlicher Organe. Im Rahmen einer lichtabhängigen Stressantwort soll die Akkumulation von Flavonoid-Derivaten (u.a. Anthocyanen) hauptsächlich zur Beschattung zellulärer Bestandteile und darunterliegender Zellschichten dienen (Passeri et al., 2016).

Sofern nicht anders angegeben, beziehen sich die folgenden Ausführungen auf die umfangreichen Übersichtsartikel von Fraser und Chapple (2011); Maeda und Dudareva (2012); Jaakola, 2013); Petrusa et al. (2013); Saito et al. (2013).



**Abbildung 1.18: Die Phenylpropanoid- und Flavonoidbiosynthese.**

Das plastidäre Phenylalanin (Produkt des Shikimat-Weges) wird im Phenylpropanoidbiosyntheseweg zum p-Coumaroyl CoA umgesetzt, welches das Substrat für die Flavonoidbiosynthese ist. Während der Flavonoidbiosynthese werden Flavonolglycoside, Anthocyane und oxidierte Tannine synthetisiert. Die Abkürzungen der Enzyme sind in Rot, die Namen der Mutanten in Grün dargestellt. *tt*, *transparent testa*. Weitere Erläuterungen im Text. Die Abbildung wurde in Anlehnung an Appelhagen et al. (2014) erstellt.

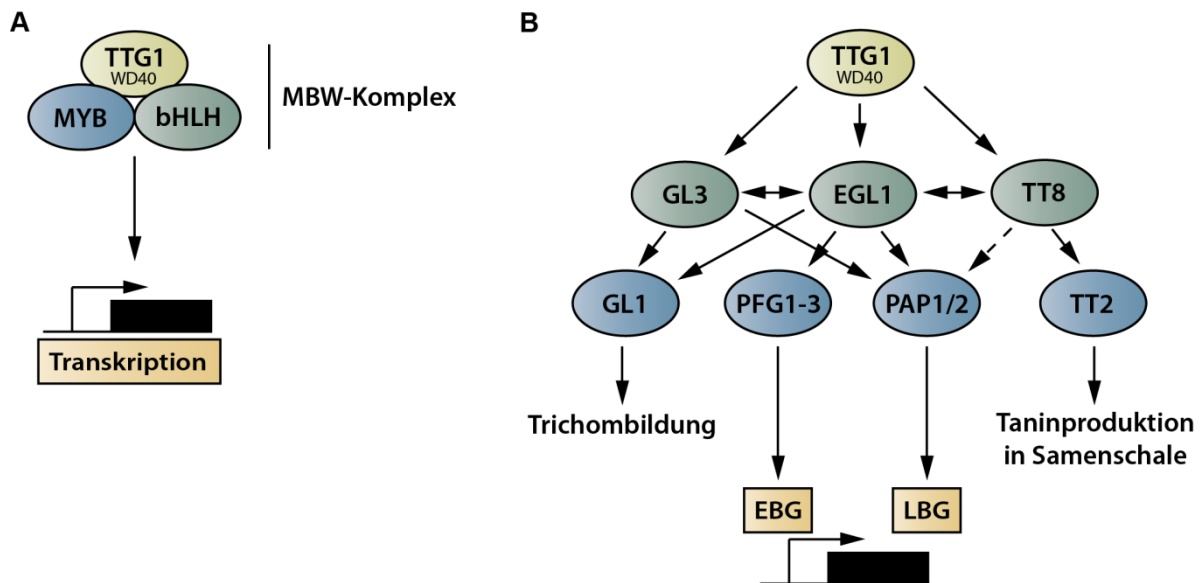
Eingeleitet wird die cytosolische Flavonoidbiosynthese durch die Reaktionen der Phenylpropanoidbiosynthese (Abbildung 1.18). Innerhalb dieser wird das in den Plastiden synthetisierte und in das Cytosol exportierte (Widhalm et al., 2015) Phenylalanin zunächst zur Zimtsäure umgewandelt. Die in *Arabidopsis* durch vier Isoformen kodierte PHENYLALANINE AMMONIA LYASE (PAL1-4) spaltet Ammonium ab und setzt Zimtsäure frei. Im nächsten Schritt wird die Zimtsäure durch eine CINNAMIC ACID 4-HYDROXYLASE (C4H) hydroxyliert und anschließend die entstandene p-Coumarinsäure durch eine von vier 4-COUMARIC ACID CoA-LIGASE (4CL1-4) mit Coenzym A (CoA) verknüpft. Sowohl das aus dieser Reaktion hervorgehende p-Coumaroyl-CoA, als auch die vorhergehende p-Coumarinsäure, sind die Ausgangsstoffe für die Synthese von Ligninen, welche als Biopolymere in die pflanzliche Zellwand eingelagert werden (Abbildung 1.18).

Mit der ersten Reaktion der Flavonoidbiosynthese wird Malonyl-CoA, das ebenfalls Substrat der Fettsäuresynthese ist, mit dem p-Coumaroyl-CoA unter Freisetzung von CO<sub>2</sub> verestert. Katalysiert wird dieser Schritt durch das ratenlimitierende Enzym der Flavonoidbiosynthese, die CHALCON SYNTHASE (CHS). Das entstandene Tetrahydroxychalcon (auch Naringeninchalcon) wird durch die CHALCON ISOMERASE (CHI) zum Naringenin umgesetzt (Abbildung 1.18). Mit den folgenden

Aktivitäten wird dieses oxygeniert, reduziert, isomerisiert und durch eine Glucosylierung stabilisiert. Im Resultat entstehen so die Vorstufen für die Synthese von Flavonolglycosiden, Anthocyanen und oxidierten Tanninen. In *Arabidopsis* wurden 54 Flavonoide identifiziert (35 Flavonole, 11 Anthocyane und 8 oxidierte Tannine) (Saito et al., 2013). Diese Vielzahl von Endprodukten lässt sich durch umfangreiche Modifikationen an unterschiedlichen Positionen der Intermediate erklären (z.B. Verknüpfung mit Glucose, Rhamnose oder Arabinose, Methylierungen und Acetylierungen). Während Flavonolglycoside und Anthocyane bestimmend für die Färbung pflanzlicher Organe sind (Blätter, Blüten, Früchte usw.), akkumulieren die braunen Tannine hauptsächlich in der Samenschale. Daher haben die Samen von Mutanten des Flavonoidbiosyntheseweges häufig eine andere Färbung als die des korrespondierenden WT. Aus diesem Grunde hat es sich auch ergeben, dass Mutanten mit einer defizitären Flavonoidbiosynthese als *tannin-deficient seeds (tds)* oder *transparent testa (tt)* (Testa= Samenschale) bezeichnet werden (Appelhagen et al., 2014).

### **1.9.2 Transkriptionelle Regulation der Phenylpropanoid-/Flavonoidbiosynthese**

Die Flavonoid-, wie auch die Phenylpropanoidbiosynthese als vorgeschalteter Stoffwechselweg, unterliegen einer strikten transkriptionellen Regulation. Die für die Synthese der Endprodukte dieser Synthesewege notwendigen Gene werden in verschiedenen Geweben und zu unterschiedlichen Zeitpunkten in der Entwicklung von Pflanzen(-organen) differentiell exprimiert. Dabei werden die Gewebespezifität und die entwicklungsabhängige Transkription durch einen konservierten Komplex von Transkriptionsfaktoren bestimmt (Passeri et al., 2016). Neben einem Transkriptionsfaktor (TF) der WD40-Familie (strukturelle Domäne von 40 Aminosäuren, die auf Tryptophan (W) und Aspartat (D) endet), ist ein bHLH (BASIC HELIX-LOOP-HELIX) und MYB (MYELOBLASTOSIS) TF an der Bildung des transkriptionsaktiven MYB-bHLH-WD40 (MBW)-Komplex beteiligt (Abbildung 1.19) (Xu et al., 2015; Passeri et al., 2016). Bisher wurde nur ein WD40-Protein beschrieben, welches in allen regulatorischen Vorgängen des MBW-Komplexes involviert ist (TRANSPARENT TESTA GLABRA 1, TTG1, Zhang et al. (2003); Xu et al. (2015)). Während TTG1 in allen Geweben gleichermaßen exprimiert wird, bestimmen die gewebespezifischen und von äußeren Einflüssen abhängigen Aktivitäten unterschiedlicher MYBs (und zum Teil auch der bHLH) über die Expression der für die Synthese von Flavonolglycosiden, Anthocyanen und oxidierten Tanninen notwendigen Genprodukte (Allan et al., 2008; Dubos et al., 2010; Passeri et al., 2016). Die Spezifität des MBW-Komplexes wird hauptsächlich durch den MYB-Partner bestimmt. Von drei bHLH-TF, TT8, GLABRA 3 (GL3) und ENHANCER of GL1 (EGL1), weiß man, dass sie zum Teil komplementär, aber auch spezifisch die Flavonoidbiosynthesegene und weitere Prozesse regulieren (Abbildung 1.19), wie zum Beispiel die Trichombildung (Zhang et al., 2003; Xu et al., 2015).



**Abbildung 1.19:** Schematische Darstellung der Transkriptionsregulation der Flavonoidbiosynthese und weiterer Prozesse durch einen Komplex aus MYB, bHLH und WD40 Transkriptionsfaktoren.

(A) Exemplarischer Aufbau eines transkriptionsaktiven MYB-bHLH-WD40 (MBW)-Komplex. (B) Auszug bekannter Transkriptionsfaktoren und ihrer Funktion in der Regulation der Flavonoid-/Anthocyanbiosynthese. Die bHLH-TF sind in Grün, die MYB-TF in Blau dargestellt. Die Abbildung wurde in Anlehnung an Zhang et al. (2003) erstellt. Weitere Erläuterungen im Text.

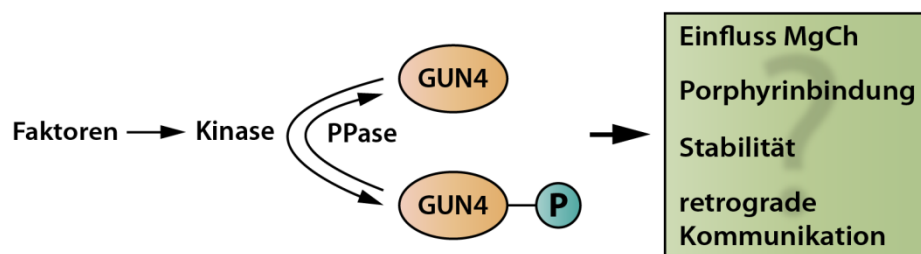
Die Flavonoidbiosynthesegene wurden in die sogenannten *early biosynthesis genes* (EBGs) und *late biosynthesis genes* (LBGs) eingruppiert. Zu den EBGs zählen die *CHS*, *CHI*, *F3H*, und *F3'H*. Die LBGs kodieren dementsprechend für Genprodukte die *downstream* der EBGs im Stoffwechselweg aktiv sind (zum Beispiel DFR und LDOX) (Abbildung 1.18) (Xu et al., 2015). In Abhängigkeit der Anwesenheit verschiedener MYB-TF im MBW-Komplex werden die EBG und LBG unterschiedlich stark induziert. Die MYB-TF PRODUCTION OF FLAVONOL GLYCOSIDES1-3 (PFG1-3; MYB12, 11 und 111) kontrollieren die Expression der EBGs und damit die Synthese von Flavonolglycosiden in unterschiedlichen Geweben (Stracke et al., 2007). PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT 1 und 2 (PAP1/2, MYB75/90) regulieren hingegen die Expression der strukturellen Gene, die zur Synthese der Anthocyane notwendig sind (LBGs) (Tohge et al., 2005; Dubos et al., 2010) (Abbildung 1.19). PAP1 kann ebenfalls die Gene der vorgeschalteten Phenylpropanoidbiosynthese aktivieren (PAL, 4CL, CHS; Tohge et al. (2005)).



## 1.10 Zielstellung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit sollte die Analyse des Einflusses der Phosphorylierung von GUN4 auf dessen Funktion innerhalb der TBS stehen. Als Stimulator der MgCh-Reaktion nimmt GUN4 einen positiven Einfluss auf die MgCh-Reaktion und den Fluss von Intermediaten innerhalb der TBS.

Zunächst sollte die zuvor identifizierte Phosphorylierungsstelle des *Arabidopsis* GUN4 in einem zu entwickelnden Kinaseassay mit Pflanzenextrakten und rekombinanten GUN4-Proteinen verifiziert werden. Der Einfluss der GUN4-Phosphorylierung sollte anschließend im Rahmen eines Komplementationsassay einer *gun4 knockout* Mutante mit phosphorylierbarem, nicht-phosphorylierbarem und einer phosphomimikry Version des GUN4 untersucht werden. Mit der Erwartung, eine physiologische Notwendigkeit der GUN4-Phosphorylierung ableiten zu können, wurden die Komplementationslinien mit physiologischen, biochemischen und genetischen Methoden charakterisiert. Ergänzt werden sollten diese Analysen durch proteinbiochemische Versuche mit heterolog exprimierten Komponenten der MgCh und den GUN4-Proteinen aus Cyanobakterien, Grünalgen und Angiospermen. Dabei lag der Fokus auf den in der Einleitung beschriebenen Eigenschaften und Funktionen von GUN4 (Abbildung 1.20). Im konkreten wurde analysiert, ob GUN4 als positiver Regulator der MgCh einen zweiten, möglicherweise inaktiven Zustand kennt, der durch die Phosphorylierung hergestellt wird. Ferner sollten die Porphyrinbindungseigenschaften sowie die Existenz eines allgemeinen oder phosphorylierungsspezifischen Abbauweges von GUN4 analysiert werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, inwiefern die Phosphorylierung einen Einfluss auf das Auftreten verschiedener GUN4-Varianten in einem Proteinextrakt von *Arabidopsis* Pflanzen hat. Als Komponente des durch die GUN-Proteine vermittelten retrograden Signalweges sollte der Phosphorylierungszustand von GUN4 in unterschiedlichen Genotypen mit der Transkriptionsantwort nach NF-Behandlung korreliert werden.

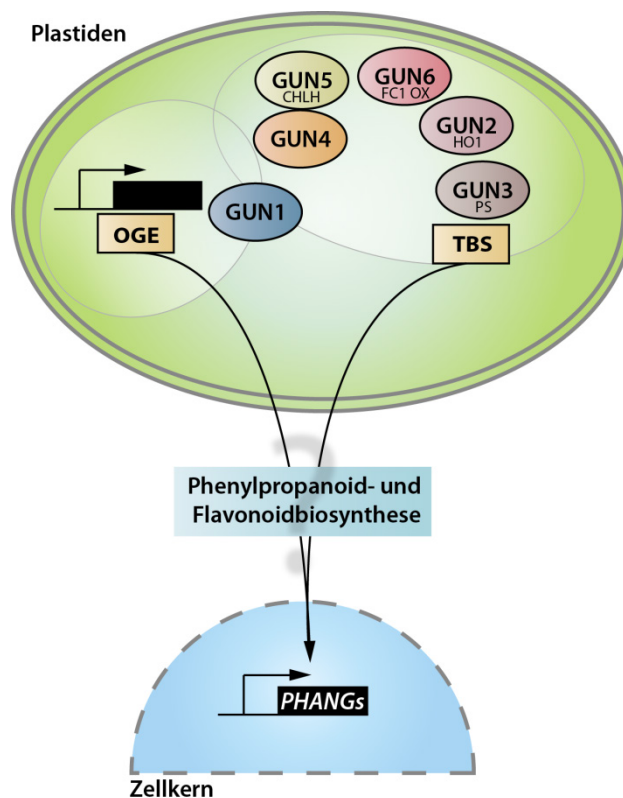


**Abbildung 1.20:** Grafische Zusammenfassung der Zielstellungen des Projektes zur GUN4-Phosphorylierung.  
PPase, Phosphatase.

Neben der Charakterisierung der GUN4-Phosphorylierung sollten Faktoren, die die Aktivität der GUN4-Kinase beeinflussen, identifiziert und Hinweise auf die Existenz einer GUN4-spezifischen

Phosphatase gesammelt werden. Zusätzlich wurde der Versuch unternommen, die GUN4-Kinase mittels biochemischer Methoden aus einem Pflanzenextrakt anzureichern und per Massenspektrometrie zu identifizieren.

Ausgehend von einer verminderten Akkumulation von Anthocyanen in *gun* Mutanten nach Norflurazon-Behandlung, sollte zusätzlich der Frage nachgegangen werden, ob und inwiefern die cytosolischen Phenylpropanoid- und Flavonoidbiosynthesewege einen Einfluss auf die von den GUN-Proteinen ausgehenden retrograden Signale haben (Abbildung 1.21). Hierfür sollten umfangreiche Studien mit genetischer und biochemischer Störung der Phenylpropanoid- und Flavonoidbiosynthese angestrebt werden. In der Hoffnung, weitere Komponenten des *biogenic signaling* zu identifizieren, wurden zum einen Expressionsstudien in anthocyandefizienten *tt* Mutanten unter NF-Behandlung durchgeführt. Zum anderen sollten Versuche mit Hemmstoffen und Intermediaten der Phenylpropanoidbiosynthese helfen, ein mögliches Signalmolekül der GUN-vermittelten retrograden Kommunikation zu identifizieren.



**Abbildung 1.21: Grafische Zusammenfassung der Fragestellung zum Einfluss der cytosolischen Phenylpropanoid- und Flavonoidbiosynthese auf die *gun*-abhängige retrograde Kommunikation.**

OGE, organelläre Genexpression. TBS, Tetrapyrrolbiosynthese. GUN, GENOMES UNCOUPLED. PHANGs, PHOTOSYNTHESIS- ASSOCIATED NUCLEAR GENES.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Anzucht von Organismen

Die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* (At) Pflanzen erfolgte auf einem Erde (GS-90)-Vermiculit-Gemisch bei 22°C im Kurztag (KT, 10h Licht), Langtag (LT, 14h Licht) oder Dauerlicht (DL, 24h Licht). Die Pflanzen wurden dabei Lichtintensitäten von 20-30  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Schwachlicht), 100-120  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Standardlicht), oder 300-600  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Starklicht) ausgesetzt. Nach der Aussaat wurde das Saatgut für zwei Tage bei 4°C stratifiziert. Sofern nicht anders angegeben wurden die physiologischen Experimente mit auf Erde angezogenen Pflanzen durchgeführt.

Die sterile Anzucht von At-Pflanzen erfolgte auf Petrischalen mit Murashige und Skoog-Medium (plus Vitaminen) versetzt mit Pflanzenanzuchtsagar (0,5xMS: 4,4 g MS [Duchefa], 0,8-1 % Agar [Difco], 1 g/l MES, pH 5,7 mit NaOH). Vor dem Ausbringen wurde das Saatgut sterilisiert. Bis zu einer Menge entsprechend von 50  $\mu\text{l}$  Saatgut wurden die Samen für 5 min in 1 mL Sterilisationslösung (70% Ethanol (v/v), 0,05% (v/v) Triton X-100) inkubiert. Anschließend wurde die Sterilisationslösung entfernt und die Samen in 70% Ethanol (v/v) gewaschen. Nach dem Absetzen wurden die Samen mit 100% Ethanol (v/v) gewaschen, das Ethanol abgenommen, die Samen an die Wand des Reaktionsgefäßes geschleudert und im geöffneten Zustand getrocknet. Die sterilisierten Samen wurden entweder trocken, oder mit sterilem Wasser versetzt, ausgebracht.

Die für die transiente Transformation genutzten *Nicotiana benthamiana* Pflanzen wurden im Langtag (16h Licht) im Gewächshaus auf Erde (Typ T) angezogen.

Der *Chlamydomonas reinhardtii* Wild-Typ Stamm CC-3395 (cwd, arg7-8, mt-; Chlamydomonas Center, University of Minnesota, St. Paul, MN, USA) wurde in TAP-Medium (Brzezowski et al., 2014) versetzt mit 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Arginin bei 50  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  und 23°C angezogen.

*Synechocystis sp.* PCC 6803 Kulturen wurden in BG-11 Medium (100 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1,1 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  und 35 mM  $\text{NaNO}_3$ ) bei 32°C unter steigender Lichtintensität (Tag 1: 50, Tag 2: 200, Tag 3: 600  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) in einem 200 ml Celldeg-Kultivator unter permanentem Schütteln (Mikrotiterplatten-Schüttler Titramax, 600rpm) angezogen. Als  $\text{CO}_2$ -Quelle wurde ein Puffergemisch von  $\text{KHCO}_3/\text{K}_2\text{CO}_3$  im Verhältnis 4:1 (v/v) im Verhältnis 1 Vol Zellkulturvolumen: 1 Vol Puffer eingesetzt (Informationen von Dr. L. Bähr, Humboldt-Universität zu Berlin).

Die Anzucht von Bakterien wird in Abschnitt 2.7.4.2 (S.96) beschrieben.

## 2.2 Probenentnahme

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle physiologischen Experimente und Analysen von Transkripten, Proteinen und Intermediaten des Tetrapyrrolstoffwechsels mit 14-21 Tage alten, auf Erde gewachsenen *At*-Pflanzen („Bubikopf“) durchgeführt. Je Probe wurde eine Vielzahl von Individuen geerntet. Je Genotyp wurden i.d.R. vier Replikate geerntet und analysiert. Alle Experimente wurden mindestens zweimal durchgeführt. Die entnommenen Proben wurden nach der Ernte im flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

## 2.3 Analysierte Genotypen

Die für diese Studie genutzten *Arabidopsis*-Genotypen sind in der untenstehenden Tabelle aufgelistet.

**Tabelle II: Genutzte und analysierte Genotypen.**

Linie	ATG-Nummer	Gen	Beschreibung	Referenz
Col-0	-	-	<i>Arabidopsis</i> Columbia Wild-Typ (WT)	-
Ler-0	-	-	<i>Arabidopsis</i> Landsberg erecta WT	-
Ws	-	-	<i>Arabidopsis</i> Wassilewskija WT	-
<i>gun1-1</i>	AT2G31400	<i>GUN1</i>	<i>GENOMES UNCOUPLED 1 / pentatricopeptide-repeat protein</i>	Koussevitzky et al. (2007) T. Pfannschmidt
<i>gun5-1</i>	AT5G13630	<i>CHLH</i>	<i>GENOMES UNCOUPLED 5</i> Mg-chelatase Untereinheit H	Mochizuki et al. (2001)
<i>gun4-1</i>	AT3G59400	<i>GUN4</i>	<i>GENOMES UNCOUPLED 4</i> Stimulator der MgCh	Larkin et al. (2003)
<i>gun4-2</i>	AT3G59400	<i>GUN4</i>	<i>GENOMES UNCOUPLED 4</i> Stimulator der MgCh	Larkin et al. (2003) Peter und Grimm (2009)
<i>gun4-3</i>	AT3G59400	<i>GUN4</i>	<i>GENOMES UNCOUPLED 4</i> Stimulator der MgCh	Peter und Grimm (2009)
<i>hy1</i>	AT2G26670	<i>HY1</i>	<i>HEME OXYGENASE1</i>	Muramoto et al. (1999) Davis et al. (1999)
<i>hy2</i>	AT3G09150	<i>HY2</i>	<i>PHYTOCHROMOBILIN SYNTHASE</i>	Kohchi et al. (2001)
<i>chl27</i>	AT3G56940	<i>CHL27</i>	<i>OXIDATIVE CYCLASE SUBUNIT CHL27</i>	Tottey et al. (2003)
<i>ntrc</i>	AT2G41680	<i>NTRC</i>	<i>NADPH DEPENDENT THIOREDOXIN REDUCTASE C</i>	Lepistö et al. (2009)
<i>cpsrp43</i>	AT2G47450	<i>cpSRP43</i>	<i>CHLOROPLAST SIGNAL RECOGNITION PARTICLE 43</i>	Prof. D. Schünemann
<i>cpsrp54</i>	AT1G15310	<i>cpSRP54</i>	<i>CHLOROPLAST SIGNAL RECOGNITION PARTICLE 54</i>	Prof. D. Schünemann
<i>cpsrp43/54</i>		<i>cpSRP43/ cpSRP54</i>	Doppelmutante aus <i>cpsrp43</i> und <i>cpsrp54</i>	Prof. D. Schünemann
<i>stn7</i>	AT1G68830	<i>STN7</i>	<i>STATE TRANSITION 7 KINASE</i>	Bonardi et al. (2005)
<i>stn8</i>	AT5G01920	<i>STN8</i>	<i>STATE TRANSITION 8 KINASE</i>	Bonardi et al. (2005)
<i>stn7/8</i>		<i>STN7/STN8</i>	Doppelmutante aus <i>stn7</i> und <i>stn8</i>	Bonardi et al. (2005)
<i>oeSTN7</i>	AT1G68830	<i>STN7</i>	Überexpressionslinie von <i>STN7</i>	Prof. D. Leister
<i>oeSTN8</i>	AT5G01920	<i>STN8</i>	Überexpressionslinie von <i>STN8</i>	Prof. D. Leister
<i>tak1-1</i>	AT4G02630	<i>TAK1</i>	<i>THYLAKOID ASSOCIATED KINASE 1</i>	Prof. B. Kohorn
<i>csk-1</i>	AT1G67840	<i>cpCSK</i>	<i>CHLOROPLAST SENSOR KINASE</i>	Prof. S. Baginsky
<i>abc1k3</i>	AT1G79600	<i>ABC1K3</i>	<i>ACTIVITY OF BC1 COMPLEX KINASE</i>	Lundquist et al. (2013)
<i>abc1k1/abc1k3</i>	AT4G31390 AT1G79600	<i>ABC1K1/ABC1K3</i>	Doppelmutante aus <i>abc1k1</i> und <i>abc1k3</i>	Lundquist et al. (2013)

Fortsetzung Tabelle II

Name	eingeführte Mutation	Beschreibung	Referenz
<b>GUN4 Komplementationslinien</b>			
<i>gun4-2/ GUN4-WT</i>	<i>GUN4(WT)</i>	homozygote <i>gun4-2</i>	diese Arbeit
<i>gun4-2/ GUN4-I</i>	<i>GUN4(S264I)</i>	Komplementationslinien	
<i>gun4-2/ GUN4-D</i>	<i>GUN4(S264D)</i>	GUN4-Konstrukte: genomisches DNA-Fragment von GUN4 (+ 800 bp 5' und + 650 bp 3') in pCambia3301	
<i>gun4-2/ GUN4-F</i>	<i>GUN4(L88F)</i>	Die eingeführten Mutationen sind in Klammern angegeben	
<i>gun4-2/ GUN4-F+I</i>	<i>GUN4(L88F+S264I)</i>		

**Kinaselinien\***

Name	ATG-Nummer	Linien-Code (T-DNA Express)	Beschreibung / T-DNA Insertionsstelle (experimentell ermittelt)	Referenz
<i>pku1-1</i>	AT5G61560	WiscDsLoxHs043_12 B	<i>PLASTID PROTEIN KINASE WITH UNKNOWN FUNCTION 1 (PKU1)</i> T-DNA Insertion: Intron 8 (Pos. 2757)	diese Arbeit/ Masterarbeit H. Gartmann
<i>pku1-2</i>		CSHL_GT8369	T-DNA Insertion: Intron 4 (Pos. 840)	
<i>pku2-1</i>	AT1G67520	SALK_004748C	<i>PLASTID PROTEIN KINASE WITH UNKNOWN FUNCTION 2 (PKU2)</i> T-DNA Insertion: Intron 1 (Pos. 1306)	
<i>pku2-2</i>	AT1G67520	SALK_070579C	T-DNA Insertion: 5'UTR (Pos. -217)	
<i>pku2-3</i>	AT1G67520	WiscDsLox497_10B	T-DNA Insertion: Intron 1 (Pos. 1407)	
<i>pku3-6</i>	AT3G51990	SALK_030551	<i>PLASTID PROTEIN KINASE WITH UNKNOWN FUNCTION 3 (PKU3)</i> T-DNA Insertion: Exon 1 (Pos. 901)	
<i>pku5-5</i>	AT3G61080	SALK_021346C	<i>PLASTID PROTEIN KINASE WITH UNKNOWN FUNCTION 5 (PKU5)</i> T-DNA Insertion: Exon 7 (Pos. 1294)	
<i>pku12-1</i>	AT5G05200	SALK_201431C	<i>PLASTID PROTEIN KINASE WITH UNKNOWN FUNCTION 12 (PKU12)</i> T-DNA Insertion: Intron 9 (Pos. 2167)	
<i>pku12-2</i>		EBN37 (FLAG_243F12 + FLAG_244C08)	T-DNA Insertion: 5'UTR (Pos. -296)	

**Anthocyanbiosynthesemutanten***tt* = transparent testa Mutanten / alle T-DNA Insertion

Name	ATG-Nummer	betroffenes Gen	Beschreibung	Referenz
<i>tt3</i>	AT5G42800	<i>DFR</i>	<i>DIHYDROFLAVONOL 4-REDUCTASE</i> , Ler-0 Hintergrund	Steven J. Rothstein Misyura et al. (2013)
<i>tt4-11</i>	AT5G13930	<i>CHS</i>	<i>CHALCONE SYNTHASE</i>	
<i>tt5-2</i>	AT3G55120	<i>CHI</i>	<i>CHALCONE ISOMERASE</i>	
<i>tt6-2</i>	AT3G51240	<i>F3H</i>	<i>FLAVANONE 3-HYDROXYLASE</i>	
<i>tt7-5</i>	AT5G07990	<i>F3'H</i>	<i>CYTOCHROME P450 75B1</i>	
<i>tt18</i>	AT4G22880	<i>LDOX</i>	<i>LEUCOANTHOCYANIDIN DIOXYGENASE</i>	
<i>ttg1-22</i>	AT5G24520	<i>TTG1</i>	<i>TRANSPARENT TESTA GLABRA 1</i>	
<i>pap1-D</i>	AT1G56650	(PAP1)	<i>PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT 1 (MYB75) Überexpresserlinie</i>	

\* An dieser Stelle sind nur die Mutantenlinien für die PKUs aufgeführt, für die eine homozygote T-DNA Insertionen und eine Reduktion des entsprechenden Transkriptes nachgewiesen werden konnte.

## **2.4 Extraktion und Analyse von Intermediaten und Endprodukten der Tetrapyrrolbiosynthese**

### **2.4.1 Extraktion**

Die Intermediate (Protoporphyrin IX: ProtoIX; Mg-protoporphyrin IX: MgP; Mg-protoporphyrin IX monomethylester: MgPMME, Protochlorophyllid: Pchlde) und Endprodukte (Chlorophylle a und b: Chl a/b und Häm) der Tetrapyrrolbiosynthese (TBS) wurden sequentiell aus einer Probe isoliert. Ca. 50-100 mg Pflanzenmaterial wurde geerntet, in einer Stahlkugel-Mühle (Retsch-Mühle, 1:30 min, 27 Hz) unter flüssigem Stickstoff zerkleinert, über Nacht lyophilisiert (mindestens 12h) und anschließend die Trockenmasse (TM) mittels Feinwaage (Sartorius) bestimmt. Das getrocknete Pflanzenmaterial wurde anschließend mit 500 µl basischem Aceton (Aceton: 0,2 M NH<sub>4</sub>OH, 9:1, (v/v)) versetzt, gemischt und für 1h bei -20°C inkubiert. Während der Inkubation wurden die Proben mehrfach mittels Vortexer gemischt. Nach einem anschließenden Zentrifugationsschritt (10 min, 4°C, maximale Geschwindigkeit) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde erneut mit 200 µl basischem Aceton versetzt, gemischt und nochmals zentrifugiert (10 min, 4°C, maximale Geschwindigkeit). Die Überstände wurden vereinigt und erneut für 30 min (4°C, maximale Geschwindigkeit) zentrifugiert. Ein Teil des gereinigten Extraktes wurde in ein HPLC-Gefäß überführt und zur Analyse der Intermediate und Chl mittels HPLC genutzt.

Zur Analyse des nicht-kovalent gebundenen Häms wurde das Pellet nach der Intermediat-/Pigmentextraktion mit 200 µl Häm-Extraktionspuffer (AHD/ Aceton: konz. HCl: DMSO, 10:0,5:2, (v/v/v)) versetzt, für 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend für 10 min (RT, maximale Geschwindigkeit) zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde vor der HPLC-Analyse erneut 30 min (RT, maximale Geschwindigkeit) zentrifugiert.

### 2.4.2 HPLC-Analyse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden eine Vielzahl von Intermediaten und Endprodukten des Tetrapyrrolstoffwechselweges mittels HPLC analysiert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die für jedes Molekül spezifischen HPLC-Programme und Parameter in Anhang II dargestellt.

### 2.4.3 Spektrophotometrische Bestimmung von Chlorophyllen und Carotinoiden

Alternativ zur Bestimmung mittels HPLC wurden Chlorophyll- und Carotinoid-Gehalte mittels Spektrophotometer bestimmt. Hierfür wurden die Pigmente mit basischem Aceton (Aceton: 0.2M  $\text{NH}_4\text{OH}$  [9:1] v/v) oder 80% Aceton (v/v) aus Pflanzenmaterial oder Chloroplasten- bzw. Thylakoidpräparationen isoliert. Die Bestimmung erfolgte nach Lichtenthaler (1987). Tabelle III zeigt die Berechnung für Extraktionen mit 80% Aceton.

<b>Tabelle III: Spektrophotometrische Chlorophyll- und Carotinoidbestimmung.</b>	
<b>Pigment</b>	<b>Formel zur Berechnung (<math>\mu\text{g ml}^{-1}</math>)</b>
Chl a	$12,25 \times (A_{663\text{nm}} - A_{720\text{nm}}) - 2,79 \times (A_{646\text{nm}} - A_{720\text{nm}})$
Chl b	$21,50 \times (A_{646\text{nm}} - A_{720\text{nm}}) - 5,10 \times (A_{663\text{nm}} - A_{720\text{nm}})$
Carotinoide	$(1000 \times (A_{470\text{nm}} - A_{720\text{nm}}) - 1,82 \times c[\text{Chl a}] - 85,02 \times c[\text{Chl b}]) / 198$

## 2.5 Bestimmung von Anthocyangehalten

Die Quantifizierung von Anthocyanen aus Blattgewebe erfolgte entsprechend der Methode von Lotkowska et al. (2015). Je nach verwendetem Frischgewicht wurden unterschiedliche Mengen von Extraktionspuffer (1 % HCl (v/v), 18 % 1-propanol (v/v), in Wasser) eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Anthocyane aus einer Probe mit 20 vier Tage alten Arabidopsis Keimlingen (in 100  $\mu\text{l}$  Puffer) oder aus Proben mit 50-100 mg Frischgewicht (0,7 – 1 ml Puffer) extrahiert. Nach 2-3 h Inkubation bei RT (dunkel) wurden die Proben für 15 min bei RT zentrifugiert (maximale Geschwindigkeit) und der Überstand am Spektralphotometer (535 nm und 650 nm) vermessen. Die Menge an isolierten Anthocyanen wurde als Absorption bei 535 nm abzüglich der Absorption bei 650 nm angegeben.

## 2.6 Behandlung von Pflanzen mit Chemikalien

### 2.6.1 Fütterung von 5-Aminolävulinsäure

Zur Erhöhung der *steady state* Porphyringehalte in *Arabidopsis* Pflanzen wurden zwei Strategien verfolgt: 1. Für die transiente ALA-Fütterung wurden auf Erde gewachsene Pflanzen (14-21 Tage alt) von ihren Wurzeln entfernt und in eine Petrischale überführt. Das Pflanzenmaterial wurde mit einer 5-Aminolävulinsäure (ALA)- Lösung (1 mM ALA (Sigma), 20 mM Tris/HCl, pH 7,2) bedeckt und für die experimentspezifischen Zeitpunkte im Licht oder in der Dunkelheit inkubiert. Die Kontrollproben wurden in Puffer ohne ALA inkubiert. 2. Zur sterilen Anzucht von *At*-Keimlingen in der permanenten Gegenwart von ALA wurde eine 1 M ALA-Lösung (20 mM Tris/HCl, pH 5,7) sterilfiltriert und anschließend in verschiedenen Endkonzentrationen dem Pflanzenanzuchtsmedium hinzugefügt.

### 2.6.2 Acifluorfen-Behandlung

Acifluorfen hemmt die Protoporphyrinogen IX oxidase (PPOX) (Jacobs et al., 1990) und ist daher geeignet eine Akkumulation von Protoporphyrin(ogen) IX, sowie eine Abnahme der im Stoffwechselweg folgenden Porphyrine (zum Beispiel MgP oder MgPMME) herbeizuführen (Richter et al., 2010). 21-Tage alte *At*-Pflanzen wurden dreimalig in der Dunkelheit mit 200  $\mu$ M Acifluorfen (Riedl de Haën, Stammlösung: 200 mM in Aceton gelöst, Sprühpuffer: 10 mM Tris, 0,05 % Tween 80 (v/v), pH 8) besprüht.

### 2.6.3 Norflurazon-Behandlung

Die Analyse des retrograden Signalweges (Susek et al., 1993) erfolgte in *At*-Pflanzen, die in Anwesenheit von Norflurazon (NF), einem Hemmstoff der Carotinoid-Biosynthese (Phytoendesaturase) (Breitenbach et al., 2001), angezogen wurden. Hierfür wurden *At*-Samen in Sterilkultur auf MS-Platten, versetzt mit 5  $\mu$ M NF (f.c.) (NF-Stammlösung: 5 mM in 100% Aceton), ausgebracht, für 2 Tage stratifiziert und bei 100  $\mu$ mol Photonen  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  für 4-5 Tage im Dauerlicht gehalten.

### 2.6.4 Hemmung der Anthocyanbiosynthese

Um gezielt enzymatische Schritte der Anthocyanbiosynthese zu hemmen, wurden *At*-Pflanzen in Sterilkultur in Anwesenheit von folgenden Chemikalien angezogen:

Die Hemmung der CINNAMATE 4-HYDROXYLASE (C4H; AT2G30490) erfolgte mit dem Substratanalogon Piperonylsäure (Schoch et al. (2002); PIP; Sigma Aldrich P49805; CAS 94-53-1).

Die 4-COUMARATE:COA LIGASE(n) (4CL) wurden mit 3,4-(Methylenedioxy) *cinnamic acid* (Funk und Brodelius (1990); MDCA; 146242 Aldrich; CAS 2373-80-0) gehemmt.

Für die Hemmung der CHALCONSYNTHASE (CHS; AT5G13930) wurden die kompetitiven Hemmstoffe Apigenin (Knogge et al. (1986); 4',5,7-trihydroxyflavone; A3145 Sigma; CAS 520-36-5) , beziehungsweise Luteolin (Peters et al. (1988); 3',4',5,7-Tetrahydroxyflavon; L9283 Sigma; CAS 491-70-3) verwendet.

PIP (Stammlösung 1 M in Dimethylformamid (DMF)), MDCA (Stammlösung 1 M in DMSO), Apigenin und Luteolin (Stammlösung 100 mM in DMF) wurden dem MS-Festmedium in den experimentspezifischen Konzentrationen zugesetzt.

### 2.6.5 Fütterung von Anthocyanvorstufen

Zu Beginn der Anthocyanbiosynthese wird Phenylalanin zu Zimtsäure und weiter zu p-Coumarinsäure umgesetzt. Zimtsäure (Stammlösung 1 M in 100% Ethanol) und p-Coumarinsäure (Stammlösung 1 M in DMSO) wurden dem MS-Festmedium in den experimentspezifischen Konzentrationen zugesetzt.

## 2.7 Molekularbiologische Methoden

### 2.7.1 RNA- Techniken

#### 2.7.1.1 Isolation von RNA aus Blattgewebe

Die Isolation von RNA aus Blattgewebe von *Arabidopsis* Blättern erfolgte nach dem Protokoll von Oñate-Sánchez und Vicente-Carbajosa (2008). Hierfür wurden 20-100 mg Blattmaterial in einer Schwingmühle unter flüssigem Stickstoff aufgeschlossen. Nach Zugabe von 300 µl Lyse-Puffer (2% SDS, 68 mM Natriumcitrat, 132 mM Zitronensäure, 1 mM EDTA) wurde das Homogenat gemischt (Vortexer) und bis zum vollständigen Auftauen bei RT inkubiert. Die Suspension wurde anschließend mit 100 µl Protein-DNA-Präzipitations-Puffer (4 M NaCl , 16 mM Natriumcitrat, 32 mM Zitronensäure) versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer anschließenden Zentrifugation (10 min, 4°C, maximale Geschwindigkeit) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert (s.o.). 300 µl des Überstandes wurden mit 300 µl Isopropanol gemischt und die RNA für 5 min (RT, maximale Geschwindigkeit) pelletiert. Das RNA-Pellet wurde mit 500 µl 70% Ethanol (v/v) gewaschen, zentrifugiert, bei RT getrocknet und in 15-25 µl Wasser (bidest) gelöst. Die RNA-Lösung wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren, für 10 min bei 65°C im Heizblock aufgetaut und anschließend für 5 min (4°C, maximale Geschwindigkeit) zentrifugiert. Die RNA-Konzentration wurde am Nano-Drop (Thermo Scientific) ermittelt.

### 2.7.1.2 Quantitative und qualitative Kontrolle der RNA und DNase-Behandlung

In der Regel wurden zwei µg RNA in 8 µl Wasser verdünnt. Vier µl der RNA-Verdünnung wurden mit 4 µl 2x RNA-Ladepuffer (Thermo Scientific) versetzt und auf einem 1,2% Agarosegel (in 0,5x TBE / 5x TBE (1 L): 54 g Tris, 27,5 Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8.0)) bei 80 V aufgetrennt. Nach qualitativer und quantitativer Kontrolle der isolierten RNA auf einem UV-Tisch, wurde die verbleibende RNA-Lösung (4 µl) mit 0,5 µl 10x DNase-Puffer und 0,5 µl DNase versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 0,5 µl 50 mM EDTA hinzugefügt und die DNase I (Thermo Scientific) für 10 min bei 65°C inaktiviert. Die RNA wurde entsprechend dem folgenden Abschnitt in cDNA umgeschrieben. Alle Inkubationsschritte erfolgten gemäß dem Protokoll aus Tabelle V in einem Thermocycler.

### 2.7.1.3 cDNA-Synthese

Die reverse Transkription der RNA in cDNA erfolgte mittels *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MuLV) Reverse Transkriptase (Thermo Scientific) unter Einsatz von oligo-dT(18)-Primern. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in Tabelle IV aufgeführt. Das verwendete Thermocycler-Programm ist Tabelle V zu entnehmen. Im Anschluss an die reverse Transkription wurde die cDNA 1:5 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt.

Tabelle IV: DNase-Behandlung und reverse Transkription von RNA.		
Komponente	Volumen (µl)	
RNA-Lösung (1-2 µg)	4	DNase-Behandlung
10x DNase-Puffer	0,5	
DNase I	0,5	
EDTA (50 mM)	0,5	
DNase-behandelte RNA	5,5	
OligodT-Primer (100 µM)	0,5	reverse Transkription
5x Reverse Transkriptase-Puf.	2	
ddH <sub>2</sub> O	0,25	
dNTPs (10 mM)	1	
RiboLock RNase Inhibitor	0,25	
Reverse Transkriptase (RT)	0,5	
Gesamt	10	

Tabelle V: Thermocycler-Programm für die DNase-Behandlung von RNA und cDNA-Synthese.		
Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)
	37	Pause
DNase-Behandlung	37	30
	37	Pause
Inaktivierung DNase	65	10
	42	Pause
reverse Transkription	42	60
	70	10
Inaktivierung RT	12	Pause

### 2.7.1.4 quantitative PCR

Die Analyse der Genexpression erfolgte mittels quantitativer (*real-time*) PCR (qPCR) in einem Bio-Rad CFX96-C1000 Thermocycler in 96-well-Platten. Die Amplifikation der Ziel-cDNAs wurde mittels *SYBR green* (Fluoreszenzfarbstoff) verfolgt, das sich in DNA-Doppelstränge einlagert. Durch die Interkalation wird der Fluoreszenzfarbstoff aktiviert und emittiert nach entsprechender Anregung Fluoreszenzlicht. Die Zusammensetzung eines qPCR-Reaktionsansatzes ist in Tabelle VI und das verwendete Thermocycler-Programm in Tabelle VII aufgeführt. Die zur Analyse der Genexpression genutzten Primerpaare sind in der Tabelle XXII im Anhang I (S. 331) aufgelistet.



**Tabelle VI: Zusammensetzung eines qPCR-Reaktionsansatzes.**

Komponente	Volumen (µl)
cDNA	1
ddH <sub>2</sub> O	3,96
Primer (vorwärts) 100 µM	0,02
Primer (rückwärts) 100 µM	0,02
2x SYBR green Mix (Biotool)	5
Gesamt	10

**Tabelle VII: qPCR Programm.**

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit
1	95	10 min
2	95	10 s
3	60	15 s
4	72	20 s
Zyklen (Schritt 2-4): 40x		
<b>Schmelzkurve</b>	95°C	10 s
	65°C > 95°C (Δ0,5 °C)	5 s

Die Auswertung der Genexpression erfolgte mit der Bio-Rad CFX-Manager Software 1.6 und der darin implementierten Methode zur relativen Quantifizierung der Genexpression mittels  $\Delta\Delta C(t)$ -Methode (Pfaffl, 2001). Diese beinhaltet die Normierung der Expressionsstärke eines Zielgenes auf die Expressionsstärke eines oder mehrerer Referenzgen(e) innerhalb einer Probe „X“ ( $\Delta C(t)$ ). Anschließend wird die relative Expression des Zielgens in einer Probe „X“ (z.B. Mutante) auf die relative Expression des Zielgens in einer Kontroll-Probe (z.B. Wild-Typ) bezogen ( $\Delta\Delta C(t)$ ). Die Daten der qPCR-Analysen werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes ( $\pm$ SEM) angegeben.

## 2.7.2 DNA- Techniken

### 2.7.2.1 Schnelle Isolation von genomischer DNA aus Pflanzenmaterial

Genomische DNA von *At*-Blättern wurde nach dem in Weigel und Glazebrook (2002) veröffentlichten Schnellprotokoll isoliert. Hierfür wurde eine kleine Menge ( $\leq 10$  mg) Blattmaterial in einem Reaktionsgefäß (Pistill oder Schwingmühle) mit 200 µl DNA-Extraktionspuffer (200 mM Tris, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS (w/v), pH7.5) homogenisiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min, RT, maximale Geschwindigkeit) wurde der Überstand mit 200 µl Isopropanol versetzt und die DNA für 5 min (RT, maximale Geschwindigkeit) in der Zentrifuge präzipitiert. Das Pellet – meist nicht sichtbar – wurde einmal mit 500 µl 70% Ethanol (v/v) gewaschen und erneut pelletiert (s.o.). Nach Trocknung bei RT wurde die DNA in 100 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### 2.7.2.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden zwei verschiedene PCR-Strategien verfolgt: Für die Genotypisierung oder Test-PCRs (z.B. Kolonie-PCR) wurde die Dream-Taq Polymerase (Thermo Scientific) verwendet. Für die Amplifikation von Fragmenten für die Klonierung von Genexpressions-Konstrukten (pflanzlich oder bakteriell) wurden die Fragmente mit einer *proof reading* Polymerase (Phusion (NEB)) amplifiziert. In Tabelle VIII ist die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes exemplarisch dargestellt. In Abhängigkeit des experimentellen Ansatzes kamen genomische DNA, cDNA, Bakterienzellen oder aufgereinigte Plasmide als Template zum Einsatz. Je nach verwendetem Primerpaar (siehe Tabelle XXII aus dem Anhang) und Länge des Amplifikats variierten die

Thermocycler-Programme, folgten im Wesentlichen jedoch dem in Tabelle IX dargestellten Schema. Die Analyse von PCR-Fragmenten erfolgte auf 0,8-2% Agarosegelen in 1xTAE (50xTAE Stammlösung (1 L): 242 g Tris, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8), 57,1 ml Essigsäure (wasserfrei)). Sofern nicht bereits im Polymerase-Puffersystem vorhanden musste den PCR-Ansätzen vor der Analyse auf einem Agarosegel Ladepuffer (5x: 100mM EDTA, 50% Glycerin (v/v), 0,1% Bromphenolblau (w/v)) hinzugefügt werden. Zur Färbung der DNA-Fragmente wurde der geschmolzenen Agarose Ethidiumbromid (3 µl/ 100 ml Gel) hinzugefügt.

Tabelle VIII: Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes.	
Komponente	Volumen (µl)
10x DreamTaq- / 5x Phusion-Puffer	2 / 4
10 mM dNTPs	0,8
Primer (vorwärts) 10 µM	0,4
Primer (rückwärts) 10 µM	0,4
Polymerase (DreamTaq / Phusion)	0,1
Template	variabel
ddH <sub>2</sub> O	auf 20 µl
Gesamt	20

Tabelle IX: Standard PCR Programm.		
Schritt	Temperatur (°C)	Zeit
1	95	2 min
2	95	30 s
3	primerspezifisch	15-25 s
4	72	variabel*
5	12	pause
Zyklen (Schritt 2-4): bis zu 40x		
* i.d.R. 15-30 s / 1 kb Amplikon-Länge		

## Genotypisierungs-PCR

Die Genotypisierung von *Arabidopsis* Pflanzen erfolgte unter Einsatz von genomischer DNA und linienspezifischen Primern (Tabelle XXII, S.331). Ein Primerpaar diente der Amplifikation des WT-Allels (LP+RP-Primer), ein zweites Primerpaar diente der Amplifikation einer möglichen T-DNA (LB+RP-Primer). Die LP und RP Primer überspannen den T-DNA-Insertionsort. Mit der LB (T-DNA spezifisch) und RP Kombination wird ein Teil der T-DNA zusammen mit einem Teil der Gensequenz amplifiziert. Im Falle einer WT-Pflanze wurde nur ein Amplifikat für das WT-Allel detektiert. Eine heterozygote Mutante (ein Allel trägt eine T-DNA) zeichnete sich durch Amplifikate für beide Primerpaare aus. Eine Mutante mit homozygoter Insertion einer T-DNA in beide Allele eines Genes, zeichnete sich hingegen durch das Ausbleiben eines Amplifikates für das WT-Allel aus.

### 2.7.2.3 Einführung von Mutationen in DNA-Fragmente mittels PCR

Zur Einführung von Punktmutationen in proteinkodierende Genfragmente wurde sich zweier PCR Techniken bedient. Dabei basieren beide Methoden auf der Nutzung von mutierten Primern, welche den gewünschten Basenaustausch und damit die Mutation der kodierten Aminosäure herbeiführten. Im Falle der Mutation der Phosphorylierungsstelle von GUN4 für die rekombinante Expression in Bakterien wurden die Fragmente (S264I [Serin(264) zu Isoleucin] und S264D [Serin(264) zu Aspartat]) mit einem GUN4-Rückwärtsprimer amplifiziert, welcher den entsprechenden Basenaustausch und die zur weiteren Klonierung genutzten Restriktionsschnittstelle enthielt (Abbildung 2.1). Das gleiche

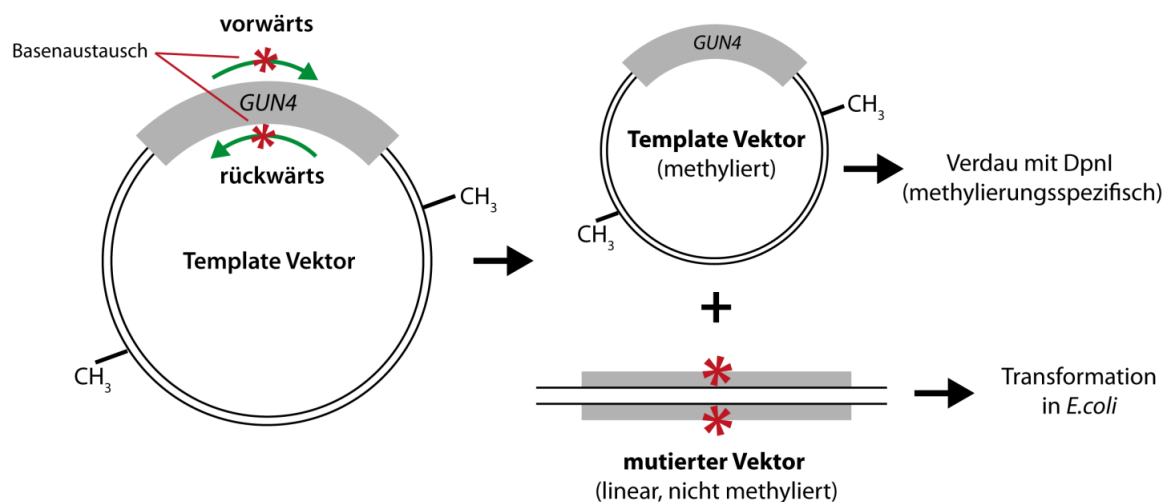
Verfahren wurde auch bei der C-terminalen Verkürzung des AtGUN4 eingesetzt. Jedoch wurden die hierbei verwendeten Rückwärtsprimer um die jeweiligen Basenpaare verkürzt.



**Abbildung 2.1: Schematische Darstellung einer SDM-PCR mit mutiertem Klonierungsprimer.**

Der Basenaustausch (\*) wird über den mutierten Rückwärtsprimer (grüner Pfeil) in das Amplifikat eingefügt. Eine fiktive Restriktionsschnittstelle (rote Linie), welche zur Klonierung genutzt wurde, ist hervorgehoben. Verhältnisse nicht maßstabsgerecht.

Die zweite Möglichkeit Mutationen in ein DNA-Fragment einzuführen, basiert auf einer PCR, die ebenfalls mutierte Primer nutzt. Im Gegensatz zur ersten Variante wurde bei dieser PCR jedoch ein bereits klonierter Vektor (z.B. Pflanzentransformationsvektor) als Template für die Amplifikation eingesetzt und der gesamte Vektor vervielfältigt (Laible und Boonrod, 2009). Die eingesetzten Primer waren komplementär zu einander, sodass nach der SDM-PCR die amplifizierten Einzelstränge des Vektors den jeweiligen, an derselben Position befindlichen, Basenaustausch trugen (Abbildung 2.2).



**Abbildung 2.2: Schematische Darstellung einer SDM-PCR mit mutierten Vorwärts- und Rückwärtsprimern und Vektor-DNA als Template.**

Der Basenaustausch (\*) wird über den mutierten Primer (grüner Pfeil) in das Amplifikat eingefügt. Verhältnisse nicht maßstabsgerecht.

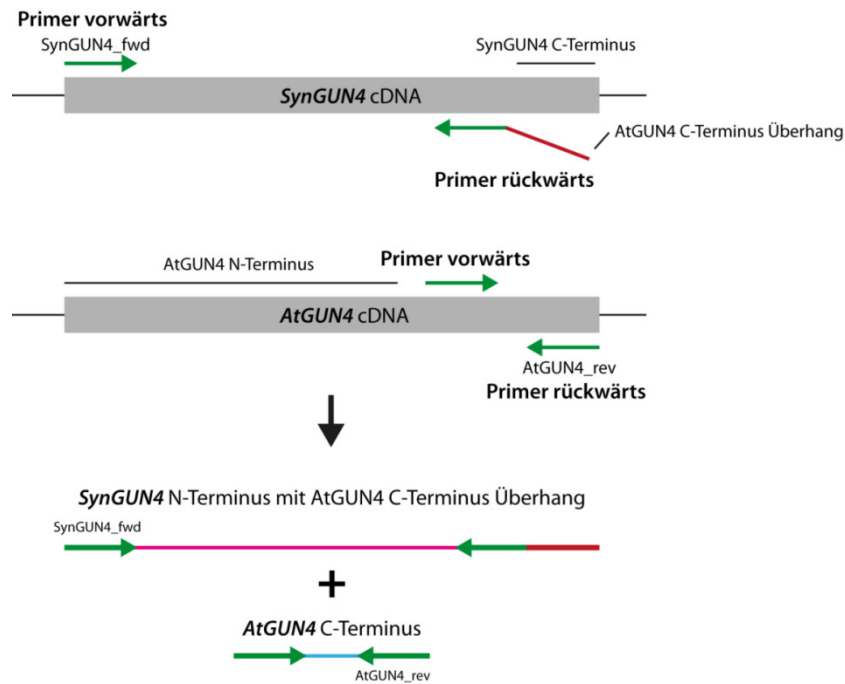
Nach erfolgreicher PCR wurde der Template-Vektor, der aus einer Bakterien-Präparation stammt und folglich DNA-Methylierungen aufweist, mit einem methylierungsspezifischem Restriktionsenzym (DpnI, NEB) verdaut. Die verbleibenden, linearen Amplifikate, die den gesamten Vektor repräsentieren sollten, werden anschließend in *E.coli*-Zellen transformiert und dort zu einem funktionellen, zirkulären Plasmid verknüpft (siehe Abschnitt 2.7.4.3, S.97).

Diese Art der SDM-PCR wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit für Plasmide bis zu einer Größe von von 8 kb (unter Nutzung der Phusion-Polymerase) genutzt. Als Template wurde aus Bakterien aufgereinigte Plasmid-DNA (10-50 ng / 20 µl PCR-Ansatz) eingesetzt. Die Primer wiesen eine Länge von 30-36 bp mit zentral gelegener Mutation auf. Das verwendete PCR-Programm unterscheidet sich in folgenden Punkten von dem in Tabelle IX gezeigten: die Annealing-Temperatur wurde auf 55°C und die Elongationszeit auf 1 min / 1 kb festgelegt. Die Zyklen-Zahl wurde auf 20-25 reduziert. Nach der PCR wurden 5 µl PCR-Ansatz, mit DNA-Ladepuffer versetzt und auf einem 0,8% Agarosegel analysiert.

#### **2.7.2.4 Erzeugung chimärer GUN4-Fragmente mittels Fusions-PCR**

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des GUN4 C-Terminus auf die Fähigkeit zur Stimulation der MgCh untersucht. Dabei war es notwendig den *At*GUN4 C-Terminus (*At*<sup>C</sup>) mit den GUN4-Homologen aus *Synechocystis* (*Syn*) oder *Chlamydomonas* (*Cr*) zu fusionieren (chimäre Gene/Proteine). Zur Erzeugung chimärer Expressionskonstrukte für GUN4 wurde eine zweistufige PCR Strategie gewählt (Abbildung 2.3 und Abbildung 2.4), welche im Anschluss am Beispiel des Konstruktes für *Syn*GUN4-*At*<sup>C</sup> (*Syn*GUN4 N-Terminus fusioniert mit *At*GUN4 C-Terminus) näher erläutert werden soll.

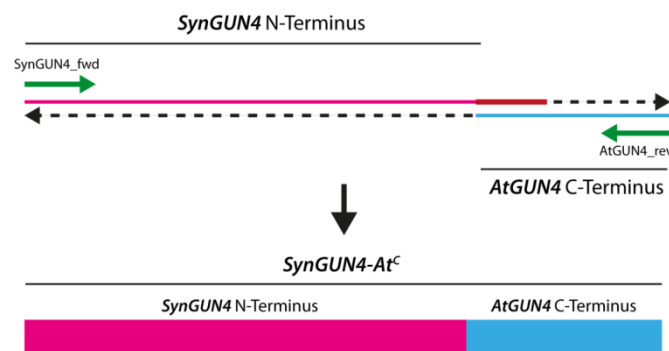
In der ersten Stufe wurde der *Syn/Cr* N-Terminus (ohne C-terminale Erweiterung) mit einem Rückwärtsprimer amplifiziert, welcher einen Überhang (komplementär zum zu fusionierenden *At*GUN4 C-Terminus) enthielt. In einem zweiten PCR-Ansatz wurde der *At*GUN4 C-Terminus amplifiziert (Abbildung 2.3).



**Abbildung 2.3:** Schematische Darstellung der ersten PCR-Stufe zur Erzeugung chimärer Fusionskonstrukte gezeigt am Beispiel von *Synechocystis GUN4 N-Terminus* (pink) und *AtGUN4 C-Terminus* (blau).

Der Rückwärtsprimer zur Amplifikation des *SynGUN4 N-Terminus* enthält einen zum *GUN4 C-Terminus* komplementären Bereich (grüner Pfeil mit roter Linie). Verhältnisse nicht maßstabsgerecht.

Nach erfolgreicher PCR wurden die aufgereinigten Fragmente in der zweiten PCR-Stufe eingesetzt. Dabei waren die Fragmente Template und Primer zugleich. Ergänzt wurde die zweite PCR um den *Syn/CrGUN4*-Vorwärts- und *AtGUN4 C-Terminus* Rückwärtsprimer (Abbildung 2.4). Die per PCR fusionierten Fragmente wurden für die anschließende Ligation in den Zielvektor genutzt.



**Abbildung 2.4:** Schematische Darstellung der zweiten PCR-Stufe zur Erzeugung chimärer Fusionskonstrukte gezeigt am Beispiel von *Synechocystis GUN4 N-Terminus* (pink) und *AtGUN4 C-Terminus* (blau).

Die zuvor erzeugten PCR-Fragmente sind Template und Primer zu gleich und werden durch die Primer (grüne Pfeile) während der PCR aufgefüllt. Verhältnisse nicht maßstabsgerecht.

#### **2.7.2.5 Klonierung von PCR-Fragmenten**

Im Anschluss an eine PCR wurden die Fragmente per Gelextraktions-Kit (Invisorb Spin DNA Extraction Kit, Stratec molecular) aus dem Agarosegel aufgereinigt und mittels T4 DNA-Ligase (Hersteller NEB) entsprechend der Kit-Anleitung in einen Zwischenvektor (pJet 1.2, CloneJet-Kit, Thermo Scientific) ligiert. Fünf µl des Ligationsansatzes wurden per Hitzeschock in 50 µl *E.coli* DH5α Zellen transformiert und anschließend auf antibiotikahaltigen LB-Platten ausgebracht (siehe Abschnitt 2.7.4.3, S.97). Die über Nacht gewachsenen Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR (siehe Tabelle IX, 30 Zyklen) auf die Anwesenheit des Vektors überprüft, positiv selektierte Kolonien in 3 ml flüssiges LB-Medium überimpft und über Nacht angezogen.

#### **2.7.2.6 Plasmidpräparation**

Zwei ml einer über Nacht gewachsenen *E.coli* Kultur wurden abzentrifugiert (RT, 1 min, maximale Geschwindigkeit) und das Pellet in 300 µl Puffer 1 (50 mM Tris; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNaseA; pH 8.0 mit HCl) resuspendiert. Anschließend wurden 300 µl P2 (200 mM NaOH; 1% SDS (w/v)) hinzugefügt, das Gefäß 4-5x invertiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl P3 (3 M Kalium Acetat; pH 5.5) wurde das Gemisch erneut invertiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Plasmidpräparation bei maximaler Geschwindigkeit für 10 min (4°C) zentrifugiert, 800 µl Überstand mit 0,7 Volumen (hier: 560 µl) Isopropanol versetzt und erneut zentrifugiert (maximale Geschwindigkeit; 10 min; 4°C). Das erhaltene Pellet wurde mit 75% Ethanol (v/v) gewaschen, zentrifugiert und für 5-10 Minuten an der Luft getrocknet. Abschließend wurde die Plasmid-DNA in 30-50 µl dest. Wasser aufgenommen.

#### **2.7.2.7 Restriktionsverdau**

Teile der zuvor isolierten Plasmid-DNA wurden entsprechend des Hersteller-Protokolls mittels Restriktions-Endonukleasen (NEB) verdaut und anschließend auf einem Agarosegel analysiert. Die schnelle Überprüfung isolierter Plasmide erfolgte mittels „Test-Verdau“ für eine Stunde. Für den Verdau von Zielvektoren, oder zum Ausschneiden von Fragmenten für die weitere Klonierung wurde der Verdau über Nacht durchgeführt. Geöffnete Vektoren und ausgeschnittene Fragmente wurden mittels Invisorb Spin DNA Extraction Kit (Stratec molecular) aus Agarosegelen aufgereinigt.

#### **2.7.2.8 Klonierung in einen Zielvektor**

Der zuvor verdaute Endvektor (z.B. pQE80L oder pCambia3301) wurde vor der weiteren Verwendung de-phosphoryliert (10% Arctic Phosphatase (v/v) (NEB); 10% 10x Phosphatase Puffer (v/v)) und anschließend aufgereinigt. Das ebenfalls gereinigte Fragment wurde in einer Ligationsreaktion (0,5 µl T4-DNA-Ligase (NEB); 1 µl 10xPuffer; Vektor:Insert (1:3) auf 10 µl Gesamtvolumen) für 30 min (RT) oder über Nacht (bei 4°C) in den Endvektor kloniert. Teile des Ligationsansatzes wurden anschließend

in *E.coli* DH5 $\alpha$  transformiert (Abschnitt 2.7.4.3, S.97), positive Kolonien selektiert und die Plasmid-DNA erneut isoliert. Die finalen Konstrukte wurden durch „DLMBC, Gewerbliche Dienstleistungen in der Molekularbiologie“ sequenziert (BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit mit dem ABI 377 automatischen DNA Sequenzierer, Applied Biosystems).

### 2.7.3 Erzeugte und verwendete Konstrukte

Die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten und verwendeten Konstrukte sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

**Tabelle X: Erzeugte und in dieser Arbeit verwendete Konstrukte.**

Teile der Konstrukte wurden im Rahmen von betreuten Projektmodulen, Bachelor- und Masterarbeiten erstellt (siehe Referenz). aa = Aminosäuren. bp= Basenpaare. *At*= *Arabidopsis thaliana*, *Os*= *Oryza sativa*, *Cr*= *Chlamydomonas reinhardtii*, *Syn*= *Synechocystis*

Konstrukt	Vektor	Resistenz <sup>1</sup>	kodierte Sequenz	Template	Bemerkungen	Referenz
<b>Pflanzentransformation</b>						
pCambia_AtGUN4(WT)_gDNA	pCambia3301	Km/BASTA	<i>AtGUN4</i> (AT3G59400)	Col-0 genomische DNA		diese Arbeit
pCambia_AtGUN4(S264I)_gDNA	pCambia3301	Km/BASTA	<i>AtGUN4</i>	pCambia_GUN4(WT)_gDNA		diese Arbeit
pCambia_AtGUN4(S264D)_gDNA	pCambia3301	Km/BASTA	<i>AtGUN4</i>	pCambia_GUN4(WT)_gDNA		diese Arbeit
pCambia_AtGUN4(L88F)_gDNA	pCambia3301	Km/BASTA	<i>AtGUN4</i>	pCambia_GUN4(WT)_gDNA		diese Arbeit
pCambia_AtGUN4(L88F+S264I)_gDNA	pCambia3301	Km/BASTA	<i>AtGUN4</i>	pCambia_GUN4(L88F)_gDNA		diese Arbeit
pCambia_AtGUN4(R115K)_gDNA	pCambia3301	Km/BASTA	<i>AtGUN4</i>	pCambia_GUN4(WT)_gDNA		diese Arbeit/ Bachelorarbeit A.Kwast
pCambia_AtGUN4(R115A)_gDNA	pCambia3301	Km/BASTA	<i>AtGUN4</i>	pCambia_GUN4(WT)_gDNA		diese Arbeit/ Bachelorarbeit A.Kwast
pCambia_AtGUN4(Y117S)_gDNA	pCambia3301	Km/BASTA	<i>AtGUN4</i>	pCambia_GUN4(WT)_gDNA		diese Arbeit/ Bachelorarbeit A.Kwast
pCambia_AtGUN4(Y117F)_gDNA	pCambia3301	Km/BASTA	<i>AtGUN4</i>	pCambia_GUN4(WT)_gDNA		diese Arbeit/ Bachelorarbeit A.Kwast
pCambia_AtGUN4(V118D)_gDNA	pCambia3301	Km/BASTA	<i>AtGUN4</i>	pCambia_GUN4(WT)_gDNA	genomisches Fragment mit 800bp <i>upstream</i> (5') und 600bp <i>downstream</i> (3') des GUN4-Exon	diese Arbeit/ Bachelorarbeit A.Kwast
pCambia_AtGUN4(F119W)_gDNA	pCambia3301	Km/BASTA	<i>AtGUN4</i>	pCambia_GUN4(WT)_gDNA		diese Arbeit/ Bachelorarbeit A.Kwast
pCambia_AtGUN4(F119Y)_gDNA	pCambia3301	Km/BASTA	<i>AtGUN4</i>	pCambia_GUN4(WT)_gDNA		diese Arbeit/ Bachelorarbeit A.Kwast
pCambia_AtGUN4(F120W)_gDNA	pCambia3301	Km/BASTA	<i>AtGUN4</i>	pCambia_GUN4(WT)_gDNA		diese Arbeit/ Bachelorarbeit A.Kwast
pCambia_AtGUN4(F120Y)_gDNA	pCambia3301	Km/BASTA	<i>AtGUN4</i>	pCambia_GUN4(WT)_gDNA		diese Arbeit/ Bachelorarbeit A.Kwast
pCambia_AtGUN4(F120A)_gDNA	pCambia3301	Km/BASTA	<i>AtGUN4</i>	pCambia_GUN4(WT)_gDNA		diese Arbeit/ Bachelorarbeit A.Kwast
pCambia_AtGUN4(S121Y)_gDNA	pCambia3301	Km/BASTA	<i>AtGUN4</i>	pCambia_GUN4(WT)_gDNA		diese Arbeit/ Bachelorarbeit A.Kwast
pCambia_AtGUN4(S121A)_gDNA	pCambia3301	Km/BASTA	<i>AtGUN4</i>	pCambia_GUN4(WT)_gDNA		diese Arbeit/ Bachelorarbeit A.Kwast



Konstrukt	Vektor	Resistenz <sup>1</sup>	kodierte Sequenz	Template	Bemerkungen	Referenz
pCambia_AtGUN4(E122D)_gDNA	pCambia3301	Km/BASTA	<i>AtGUN4</i>	pCambia_GUN4(WT)_gDNA	genomisches Fragment mit 800bp <i>upstream</i> (5') und 600bp <i>downstream</i> (3') des GUN4-Exon	diese Arbeit/ Bachelorarbeit A.Kwast
pCambia_AtGUN4(E122A)_gDNA	pCambia3301	Km/BASTA	<i>AtGUN4</i>	pCambia_GUN4(WT)_gDNA		diese Arbeit/ Bachelorarbeit A.Kwast
pCambia_AtGUN4(V123A)_gDNA	pCambia3301	Km/BASTA	<i>AtGUN4</i>	pCambia_GUN4(WT)_gDNA		diese Arbeit/ Bachelorarbeit A.Kwast
pCambia_AtGUN4(V123E)_gDNA	pCambia3301	Km/BASTA	<i>AtGUN4</i>	pCambia_GUN4(WT)_gDNA		diese Arbeit/ Bachelorarbeit A.Kwast
pCambia_AtGUN4(K124R)_gDNA	pCambia3301	Km/BASTA	<i>AtGUN4</i>	pCambia_GUN4(WT)_gDNA		diese Arbeit/ Bachelorarbeit A.Kwast
pCambia_AtGUN4(K124A)_gDNA	pCambia3301	Km/BASTA	<i>AtGUN4</i>	pCambia_GUN4(WT)_gDNA		diese Arbeit/ Bachelorarbeit A.Kwast
rekombinante Expression						
pQE_AtGUN4(WT)	pQE80L	Amp/-	<i>AtGUN4</i>	Col-0 cDNA	cDNA Fragment von <i>AtGUN4</i> ohne vorhergesagtem Transitpeptid (69 aa)*	diese Arbeit
pQE_AtGUN4(S264I)	pQE80L	Amp/-	<i>AtGUN4</i>	pQE_AtGUN4(WT)		diese Arbeit
pQE_AtGUN4(S264D)	pQE80L	Amp/-	<i>AtGUN4</i>	pQE_AtGUN4(WT)		diese Arbeit
pQE_AtGUN4-3	pQE80L	Amp/-	<i>AtGUN4</i>	pQE_AtGUN4(WT)	cDNA <i>AtGUN4</i> verkürzt um 3 Aminosäuren	diese Arbeit / Projektmodul F. Kuhnert
pQE_AtGUN4-6	pQE80L	Amp/-	<i>AtGUN4</i>	pQE_AtGUN4(WT)	cDNA <i>AtGUN4</i> verkürzt um 6 Aminosäuren	diese Arbeit / Projektmodul F. Kuhnert
pQE_AtGUN4-9	pQE80L	Amp/-	<i>AtGUN4</i>	pQE_AtGUN4(WT)	cDNA <i>AtGUN4</i> verkürzt um 9 Aminosäuren	diese Arbeit / Projektmodul F. Kuhnert
pQE_AtGUN4-12	pQE80L	Amp/-	<i>AtGUN4</i>	pQE_AtGUN4(WT)	cDNA <i>AtGUN4</i> verkürzt um 12 Aminosäuren	diese Arbeit / Projektmodul F. Kuhnert
pQE_SynGUN4	pQE80L	Amp/-	<i>SynGUN4/YCF53</i> (sll0558)	SynGUN4_pJet	cDNA Fragment von <i>SynGUN4</i>	diese Arbeit / A. Wilde / Bachelorarbeit C. Hochheuser
pQE_CrGUN4	pQE80L	Amp/-	<i>CrGUN4</i> (Cre05.g246800)	Chlamydomonas cDNA	cDNA Fragment von <i>CrGUN4</i> ohne vorhergesagtes Transitpeptid (45 aa)*	diese Arbeit / Bachelorarbeit C. Hochheuser
pQE_SynGUN4-At <sup>C</sup>	pQE80L	Amp/-	siehe Bemerkung	siehe Bemerkung	chimäres Konstrukt aus <i>SynGUN4</i> N-Terminus (1-226) und <i>AtGUN4</i> C-	diese Arbeit

terminus (aa 224-265)						
Konstrukt	Vektor	Resistenz <sup>1</sup>	kodierte Sequenz	Template	Bemerkungen	Referenz
pQE_CrGUN4-At <sup>c</sup>	pQE80L	Amp/-	siehe Bemerkung	siehe Bemerkung	chimäres Konstrukt aus CrGUN4 N-Terminus (aa 1-189) und AtGUN4 C-terminus (aa 224-265)	diese Arbeit
pet28_OsCHLH	pet28a	Km/-	<i>OsCHLH</i>	Oryza sativa cDNA	Reis MgCh-Untereinheit H	Zhou et al. 2012
pet28_OsCHLD	pet28a	Km/-	<i>OsCHLD</i>	Oryza sativa cDNA	Reis MgCh-Untereinheit D	Zhou et al. 2012
pet28_OsCHLI	pet28a	Km/-	<i>OsCHLI</i>	Oryza sativa cDNA	Reis MgCh-Untereinheit I	Zhou et al. 2012
pet28_OsGUN4	pet28a	Km/-	<i>OsGUN4</i>	Oryza sativa cDNA	Reis GUN4	Zhou et al. 2012
pQE80L_AtCHLM	pQE80L	Amp/-	<i>AtCHLM</i> (AT4G25080)	Col-O cDNA	cDNA Fragment von <i>Arabidopsis</i> MgP Methyltransferase	E. Peter, 2009 / Masterarbeit A.Richter
Proteinkinasen						
Lokalisierung <sup>2</sup>						
pCK205_PKU1	pCK205(GFP)	Spec/Km	AT5G61560	Col-0 cDNA	U-box domain-containing protein kinase family protein	diese Arbeit
pCK205_PKU2	pCK205(GFP)	Spec/Km	AT1G67520	Col-0 cDNA	lectin protein kinase family protein	diese Arbeit / Projektmodul H. Gartmann
pCK205_PKU3	pCK205(GFP)	Spec/Km	AT3G51990	Col-0 cDNA	Protein kinase superfamily protein	diese Arbeit
pCK205_PKU5	pCK205(GFP)	Spec/Km	AT3G61080	Col-0 cDNA	Protein kinase superfamily protein / fructosamine kinase family protein	diese Arbeit
pCK205_PK7	pCK205(GFP)	Spec/Km	AT2G39190	Col-0 cDNA	ATATH8	diese Arbeit / Projektmodul H. Gartmann
pCK205_PK10	pCK205(GFP)	Spec/Km	AT1G18160	Col-0 cDNA	Protein kinase superfamily protein	diese Arbeit / Projektmodul H. Gartmann
pCK205_PK11	pCK205(GFP)	Spec/Km	AT3G57770	Col-0 cDNA	Protein kinase superfamily protein	diese Arbeit / Projektmodul H. Gartmann
pCK205_PKU12	pCK205(GFP)	Spec/Km	AT5G05200	Col-0 cDNA	Protein kinase	diese Arbeit /



## 2.7.4 Methoden zur Transformation von Organismen

In diesem Abschnitt werden die Methoden zur Anzucht und Transformation von Bakterien, sowie die Protokolle für die transiente (*Nicotiana benthamiana*) und stabile (*Arabidopsis thaliana*) Transformation von Pflanzen beschrieben.

### 2.7.4.1 Verwendete Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit genutzten Bakterienstämme sind in Tabelle XI aufgeführt.

Tabelle XI: Verwendete Bakterienstämme.			
Stamm	Resistenz	Verwendung	Quelle
<i>E. coli</i>			
DH5 $\alpha$	-	Klonierung	Invitrogen
BL21 (DE3)	-	rekombinante Protein-Expression	Invitrogen
Rosetta (DE3)	Chloramphenicol	rekombinante Protein-Expression	Novagen
ArcticExpress	Gentamycin	rekombinante Protein-Expression	Agilent
<i>A. tumefaciens</i>			
GV2260	Rifampicin und Ampicillin	pflanzliche Transformation	

### 2.7.4.2 Anzucht von Bakterien

Die Anzucht von Bakterien erfolgte sowohl auf Fest- als auch Flüssigmedium unter Zusatz von stamm-, bzw. vektorspezifischen Antibiotika. Die verwendeten Antibiotika sind in Tabelle XII gelistet.

Tabelle XII: Verwendete Antibiotika.		
f.c = finale Konzentration		
Antibiotikum	Konzentration (f.c)	Stammlösung
Ampicillin	100 $\mu$ g/ml	100 mg/ml in 50% Ethanol (v/v)
Kanamycin	50 $\mu$ g/ml	50 mg/ml in Wasser
Gentamycin	25 $\mu$ g/ml	25 mg/ml in Wasser
Rifampicin	50 $\mu$ g/ml	50 mg/ml in DMSO
Spectinomycin	50 $\mu$ g/ml	50 mg/ml in Wasser
Chloramphenicol	34 $\mu$ g/ml	34 mg/ml in 100% Ethanol

#### Anzucht von *Escherichia coli*

Die Anzucht von *E. coli*-Stämmen erfolgte in flüssigem LB-Medium (1 l: 10 g Trypton, 5g Hefeextrakt, 10g NaCl, pH 7,0) oder auf festen LB-Platten (LB plus Bakterien-Agar (15 g / l)). Die Anzucht auf Festmedium erfolgte im Wärmeschrank bei 37°C. Flüssigkulturen wurden über Nacht bei 37°C in einem Schüttler (200 rpm) inkubiert. Auf die Anzuchtbedingungen für die rekombinante Expression von Proteinen in Bakterien wird in Abschnitt 2.8.7.1 (S.101) eingegangen.

#### Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobakterien wurden in YEB-Medium angezogen (1 l: 1 g Hefeextrakt, 5 g Pepton, 5 g Saccharose, 0,685 g MgSO<sub>4</sub>, pH 7,0). Für die Anzucht auf YEB-Platten wurde das Medium mit 15 g / l Bakterien-Agar versetzt. YEB-Platten, als auch Flüssigkulturen wurden bei 30°C im Wärmeschrank (2-3 Tage) oder Schüttler (über Nacht) inkubiert.

### 2.7.4.3 Transformation von Bakterien

#### **Escherichia coli**

*E.coli*-Stämme wurden mittels Hitzeschock transformiert. Ein Aliquot (meist 50 µl) kompetenter *E.coli* wurde auf Eis aufgetaut und mit unterschiedlichen Volumina eines Plasmides oder Ligationsansatzes (meist 1-5 µl) vermischt. Der Transformationsansatz wurde für 90 Sekunden bei 42°C und anschließend für 2 min im Eisbad inkubiert. Nach Zugabe von 300-500 µl flüssig LB wurden die Transformationsansätze für eine Stunde bei 37°C im Schüttler (200 rpm) inkubiert und anschließend ein Teil auf LB-Platten ausgebracht. Die weitere Anzucht von Kolonien erfolgte über Nacht im Wärmeschrank.

#### **Agrobacterium tumefaciens**

Zehn µl elektrisch kompetenter Agrobakterien wurden mit 1 µl gereinigtem Plasmid versetzt und in eine gekühlte Elektroporationsküvette (1 mm Plattenabstand) überführt. Die Transformation erfolgte mit einem elektrischen Impuls (Bio-Rad MikroPulser: 2,3 kV, Pulsdauer: 1-4 ms). Im Anschluss wurden die Zellen mit 300 µl flüssigem YEB gemischt und für 2-3 h bei 30°C im Schüttler (200 rpm) inkubiert und anschließend ein Teil auf YEB-Festmedium ausplattiert.

### 2.7.4.4 Transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana*

Für die transiente Expression von Proteinen (z.B. als GFP-Fusionskonstrukte für Lokalisierungsstudien) in Blättern von *Nicotiana benthamiana* wurde eine über Nacht gewachsene Agrobakterien-Kultur geerntet (5 min, maximale Geschwindigkeit, RT) und in Infiltrationsmedium (10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MES, (100 µM Acetosyringon), pH 5,7) resuspendiert. Die OD(600) wurde auf 0,4-0,6 eingestellt und die Bakteriensuspension mittels Spritze in die Unterseite der Tabakblätter infiltriert. Die infiltrierten Pflanzen wurden für 3-4 Tage im Licht oder in der Dunkelheit inkubiert und entsprechend der experimentellen Fragestellung beprobt.

### 2.7.4.5 Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Stabile Transformanten von *Arabidopsis* wurden mit der modifizierten „Floral Dip“-Methode erzeugt (Clough und Bent, 1998). Hierfür wurde eine über Nacht gewachsene Agrobakterien-Kultur geerntet (5 min, maximale Geschwindigkeit, RT) und in Inokulationsmedium (0.5% (w/v) MS, 0,05% (w/v) MES, 5% (w/v) Saccharose, 0,05% (v/v), Silwet L-77, pH 5,7) resuspendiert. Die Bakterienlösung wurde auf die sich entwickelnden Blüten von *Arabidopsis* Pflanzen getropft. Die Transformation wurde 3-4x im Abstand von 2-3 Tagen wiederholt. Nach der Samenreife wurden die transformierten

Primärtransformanten mittels geeignetem Selektionsmarker (z.B. besprüht mit Phosphinothricin/BASTA<sup>TM</sup> - Bayer Crop Science), ab 14 Tage nach der Keimung, isoliert.

## **2.8 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.8.1 Proteinisolation aus Blattgewebe**

Etwa 50-100 mg Pflanzenmaterial wurden geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und mittels Schwingmühle (Retsch) homogenisiert. Nach Zugabe von 300-500 µl Proteinextraktionspuffer (PEB: 56 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 56 mM DTT, 2% SDS (w/v), 12% Saccharose (w/v), 2 mM EDTA) wurden die Proben für 20 min bei 70°C inkubiert und anschließend zentrifugiert (RT, 10 min, maximale Geschwindigkeit). Der Überstand wurde für die weitere Verwendung in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bei -20°C gelagert.

### **2.8.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Proteinextrakten erfolgte auf zwei unterschiedliche Wegen. Die Konzentration DTT- und SDS-haltiger Proben wurden nach Fällung eines Aliquots mit dem BCA-Reagenz (Thermo Scientific) bestimmt. Proben ohne DTT und SDS konnten direkt mit der Bradford-Lösung bestimmt werden. Zur Quantifizierung der Proteinkonzentration wurde eine Eichgerade mit Rinderserumalbumin (BSA) erstellt.

#### **2.8.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mit Bradford-Reagenz**

Unterschiedliche Volumina (z.B. 1, 2, 4 µl) eines SDS- und DTT-freien Proteinextraktes wurden mit 1 ml Bradford-Reagenz (100 mg Coomassie Blue G 250 gelöst in 50 ml 95% Ethanol (v/v) und 100 ml 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (w/v), A.dest auf 1 l, filtriert) gemischt, für 5 min bei RT inkubiert und anschließend die Absorption bei 595 nm gemessen.

#### **2.8.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mit BCA-Reagenz**

25 µl eines SDS- und DTT-haltigen Proteinextraktes wurden mit 500 µl 10% TCA versetzt und dann für 20 Minuten auf Eis gefällt. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min, maximale Geschwindigkeit, 4°C) wurde das Pellet in 50 µl 0,1 N NaOH resuspendiert. Die Ermittlung des Proteingehaltes erfolgte mit BCA-Reagenz (Thermo Scientific) entsprechend der Angaben des Herstellers. Die Absorption des Farbkomplexes wurde bei 562 nm bestimmt.

### **2.8.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)**

Proteinproben die nicht mit PEB extrahiert, bzw. gewonnen wurden (z.B. rekombinante Proteine oder native Chloroplastenextrakte) wurden vorbereitend mit Ladepuffer (1x: 62,5 mM Tris, 10 %

Glycerol (v/v), 2 % SDS (w/v), 100 mM DTT, 0,05 % Bromphenolblau (w/v), pH 6,8) versetzt. Vor der Trennung von Proteinextrakten wurden diese bei 90-95°C für 5 min erhitzt und für 1 min zentrifugiert (RT, maximale Geschwindigkeit).

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinextrakten erfolgte, sofern nicht anders angegeben, auf einem Polyacrylamidgel (12% Trenngel und 5% Sammelgel, siehe Tabelle XIII). Im Falle pflanzlicher Proteinextrakte wurden je Spur 10-20 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer Elektrophoresekkammer, die mit 1x Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS (w/v), pH 8,3) befüllt wurde. Anfänglich wurde eine Spannung von 80 V, zur anschließenden Trennung eine Spannung von 120 V angelegt.

Nach vollständiger Auftrennung wurden die Proteine auf eine Membran übertragen (Abschnitt 2.8.5.1, S.100). Ein weiteres Gel wurde als Ladungskontrolle mit Proteinfärbelösung (40% Methanol (v/v), 10% Essigsäure (v/v), 0,8% Coomassie Brilliantblau (R250) (w/v)) für 30 min gefärbt und anschließend mit Entfärberlösung (40% Methanol (v/v), 10% Essigsäure (v/v)) entfärbt. Zur Lagerung wurde das Gel nach einer Rehydrierungszeit von 30 min in Wasser auf einem Filterpapier (Schleicher und Schuel) im Vakuumtrockner für 2 Stunden bei 80°C getrocknet.

<b>Tabelle XIII: Zusammensetzung eines PA-Gels.</b>		
<b>Lösung</b>	<b>Volumen (ml)</b>	
	<b>Trenngel (12%)</b>	<b>Sammelgel (5%)</b>
Wasser	1,1	0,68
Acrylamid (29%): Bisacrylamid (1%)	2,5	0,17
1,5 M Tris/ HCl pH 8,8	1,3	-
0,5 M Tris/ HCl pH 6,8	-	0,13
10% SDS (w/v)	0,05	0,01
10% Ammoniumpersulfat (w/v)	0,05	0,01
TEMED	0,002	0,001

## 2.8.4 Silberfärbung

Die Silberfärbung von Proteingelen erfolgte entsprechend der Methode von Blum et al. (1987). Die einzelnen Schritte sind in Tabelle XIV dargestellt.

<b>Tabelle XIV: Schema zur Silberfärbung von Proteingelen.</b>		
<b>Schritt</b>	<b>Behandlung</b>	<b>Zeit</b>
1 Fixierung	50 % MeOH (v/v); 12 % Essigsäure (v/v); 0,5 mL 37 % HCOHje Liter	≥ 1 h
2 Waschen	Wasser	3 X 20 min
3 Vorbehandlung	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (0,2 g/l)	1 min
4 Waschen	Wasser	3 X 20 s
5 Imprägnieren	AgNO <sub>3</sub> (2 g/l); 0,75 mL 37 % HCOH/l	20 min
6 Waschen	Wasser	2 x 20 s
7 Entwickeln	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (60 g/l); 0,5 mL 37 % HCOH/l ;Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (4 mg/l)	10 min
8 Waschen	Wasser	2 X 2 min
9 Abstoppen	50 % MeOH (v/v); 12 % Essigsäure (v/v)	10 min
10 Waschen	50 % MeOH (v/v)	≥ 20 min

## 2.8.5 Detektion von Proteinen mittels Western-Blot

### 2.8.5.1 Western-Blot

Nach Auftrennung der Proteine im Polyacrylamidgel wurden die Gele in eine *Semi Dry* Blottingapparatur (Bio-Rad) überführt. Der Blot bestand aus (von unten nach oben): 3x Filterpapier, 1x Hybond C Membran (GE Healthcare), Polyacrylamidgel, 3x Filterpapier. Die Membran wurde für 1 min in Wasser und anschließend mit den Filterpapieren in Transferpuffer (20% Methanol (v/v), 39 mM Glycin, 47,9 mM Tris, 1,3 mM SDS) inkubiert. Der Proteintransfer erfolgte mit 0,8 mA je cm<sup>2</sup> Gelfläche. Nach 1,5 h wurde die Membran in Ponceaulösung (0,1% Ponceau S (w/v), 5% Essigsäure (v/v), in Wasser) angefärbt und anschließend mit Wasser entfärbt.

### 2.8.5.2 Antikörperinkubation

Die Detektion von spezifischen Proteinen in einem Proteinextrakt erfolgte mittels immunologisch mittels Antikörperrnachweiß. Hierfür wurden die Membranen in 4% Milchpulver in TBST (12,4 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween-20, pH 7,4) für mindestens eine Stunde, wahlweise auch über Nacht bei 4°C, inkubiert. Anschließend wurden die Membranen 1x 10 min mit TBST und anschließend 2x 10 min mit TBS (12,4 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v), pH 7,4) gewaschen. Die Inkubation mit dem primären für das Zielprotein spezifischen Antikörper (siehe Tabelle XV) (in 2% Milchpulver, TBS), erfolgte für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Im Anschluss wurden die Membranen erneut gewaschen (1x 10 min mit TBST und anschließend 2x 10 min mit TBS) und mit dem sekundären, für den primären Antikörper (IgG, Peroxidase gekoppelt) spezifischen, Antikörper (in 2% Milchpulver, TBS) inkubiert. Nach erneutem Waschen (1x 10 min TBST, 5x 5 min TBS) erfolgte die Detektion der Signale mit dem CCD-Chemolumineszenz-Detektionssystem Stella (Raytest). Als Substrat für die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase wurde entweder ein selbsthergestelltes Reagenz (2 ml Lsg A: 100 mM TRIS/HCL, 25% Luminol (w/v) pH 8,5; 200 µl Lsg B: 11 mg/ 10 ml para-Hydroxycoumarinsäure in DMSO, pH 8,5; 6 µl 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) oder das kommerzielle Substrat *Clarity™ Western ECL Blotting Substrate* (Bio-Rad) verwendet.

Alle Inkubationsschritte erfolgten in 50 ml Falcon-Tubes auf einem Rotationsinkubator.



**Tabelle XV: Verwendete Antikörper.**

Antikörper	Beschreibung	Verdünnung	Referenz
$\alpha$ -GluTR	Kaninchen-IgG, gerichtet gegen AtGluTR1	1:1000	Hedtke et al. (2007)
$\alpha$ -GSAT	Kaninchen-IgG, gerichtet gegen AtGSAT	1:2000	Grimm et al. (1989)
$\alpha$ -CHLI	Kaninchen-IgG, gerichtet gegen AtCHLI	1:5000	Tao Luo
$\alpha$ -fullGUN4	Kaninchen-IgG, gerichtet gegen AtGUN4	1:2500	Peter und Grimm (2009)
$\alpha$ -pGUN4	Kaninchen-IgG, gerichtet gegen phosphorylierten AtGUN4 C-terminus	1:500-1000	diese Arbeit
$\alpha$ -np-pepGUN4	Kaninchen-IgG, gerichtet gegen <i>nicht</i> phosphorylierten AtGUN4 C-terminus	1:500-1000	diese Arbeit
$\alpha$ -CHLM	Kaninchen-IgG, Tabak CHLM	1:2000	Alawady und Grimm (2005)
$\alpha$ -CHL27	Kaninchen-IgG, AtCHL27	1:2000	Agrisera
$\alpha$ -YCF54/LCAA	Kaninchen-IgG, Tabak LCAA	1:1000	Albus et al. (2012)
$\alpha$ -POR	Kaninchen-IgG, AtPOR	1:1000	Agrisera
$\alpha$ -FLU	Kaninchen-IgG, gerichtet gegen AtFLU	1:1000	K. Apel
$\alpha$ -LHCA1	Kaninchen-IgG, gerichtet gegen AtLHCA1	1:5000	Agrisera
$\alpha$ -LHCB1	Kaninchen-IgG, gerichtet gegen AtLHCB1	1:5000	Agrisera
$\alpha$ -6xHIS	IgG gekoppelt mit Peroxidase, gerichtet gegen 6xHistidin-Polypeptid	1:2-4000	Sigma
$\alpha$ -Rabbit	IgG gekoppelt mit Peroxidase, gerichtet gegen Kaninchen IgG, aus Ziege	1:10-30000	Agrisera/Sigma

## 2.8.6 Erzeugung eines phosphorylierungsspezifischen *Arabidopsis* GUN4 Antikörpers

Der phosphorylierungsspezifische GUN4-Antikörper (pGUN4) wurde durch eine Firma erzeugt (AMSBIO Europe). Im Wesentlichen basierte die Antikörpergewinnung auf der Immunisierung von Kaninchen mit einem synthetisierten Peptid, das den C-Terminus des *Arabidopsis* GUN4 repräsentiert (C-GADKRVFKTNY(pS)F). In das Peptid wurde die zuvor bestätigte Phosphorylierungsstelle (Serin an Position 264) als Phospho-Serin eingefügt. Nach der Immunisierung wurde das Serum gegen das phosphorylierte, sowie nicht-phosphorylierte Peptid aufgereinigt. Im Ergebnis wurde ein hochspezifischer Antikörper gewonnen, welcher ausschließlich das phosphorylierte *Arabidopsis* GUN4 erkannte (pGUN4), sowie ein Antikörper, der sowohl den phosphorylierten als auch den nicht-phosphorylierten AtGUN4 C-terminus detektiert (np-pepGUN4).

## 2.8.7 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine aus Bakterien

### 2.8.7.1 Expression rekombinanter Proteine

Die Expression rekombinanter Proteine erfolgte in Stämmen von *E.coli*, die für die heterologe Expression *E.coli*-fremder Proteine entwickelt wurden (siehe Abschnitt 2.7.4.1, S.96). Die wichtigsten Modifikationen bei den Derivaten des DE3-Stammes sind dabei der *knockout* von Proteasegenen (LON (*lon*<sup>-</sup>) und OMP-T (*omp-t*<sup>-</sup>) Protease), die durch ihre proteolytische Aktivität die Akkumulation von heterologen Proteinen mindern (können). Um der unterschiedlichen Nutzung von Codons während der eu- und prokaryotischen Translation Rechnung zu tragen, exprimierte der Rosetta-Stamm zusätzlich selten in *E.coli* genutzte tRNAs (*rare codons*). Der ArcticExpress<sup>TM</sup>-Stamm zeichnete sich durch die kälteinduzierte Expression von Chaperonen aus. Diese halfen die Faltungseffizienz und

damit die Ausbeute von aktivem, rekombinantem Protein, insbesondere unter niedrigen Expressionstemperaturen, zu erhöhen.

Der (optimale) Expressionsstamm und die Expressionsbedingungen für das jeweilige Protein wurden experimentell durch Testexpressions-Serien ermittelt.

Das Expressionsprotokoll lässt sich, unabhängig vom exprimierten Protein, wie folgt zusammenfassen: Eine Expressionskultur wurde 1:50-1:100 (v/v) mit einer über Nacht gewachsenen Vorkultur des jeweiligen Expressionsstammes inokuliert. Anschließend wurde die Kultur bis zum Erreichen einer OD(600) von 0,4-0,6 (i.d.R. 2,5-3 h) bei 37°C in einem Schüttler (200 rpm) inkubiert. Anschließend erfolgte die Induktion der Expression des Transgens durch die Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG, i.d.R. 1 mM f.c.).

Dieses Laktose-Analogon induziert das Laktose-Operon (*lac*-Operon) durch die Bindung des *lac*-Repressors, der inaktiviert wird und nicht mehr an Promotoren binden kann. Als Folge können Transkriptionsfaktoren und Polymerasen an der Promotorregion binden und es kommt zur Bildung der entsprechenden mRNA. Auch die Promotoren des Transgens auf den in dieser Arbeit verwendeten Expressionsplasmiden waren zunächst durch den *lac*-Repressor inaktiviert. Erst nach Zugabe von IPTG wurden diese für Polymerasen zugänglich und das rekombinante Protein konnte gebildet werden. Nach Zugabe des IPTG wurden die Kulturen für unterschiedliche Zeiträume und Temperaturen inkubiert (Tabelle XVI). Nach Abschluss der Expression wurden die Kulturen durch Zentrifugation geerntet und die Zellpellets bei -20°C gelagert.

Die in dieser Arbeit genutzten Expressionsbedingungen für die jeweiligen Proteine sind in Tabelle XVI aufgeführt.

**Tabelle XVI: Expressionsbedingungen von rekombinanten Proteinen.**

Die angegebenen Zeiträume und Temperaturen beziehen sich auf die reine Expression der Proteine nach Induktion mit IPTG.  
ü.N.= über Nacht.

Protein	Vektor	Stamm	Antibiotikum	Temperatur	Zeit
AtGUN4 <sup>1</sup>	pQE80L	Rosetta	Amp / ChlorA	30°C	3 h
SynGUN4	pQE80L	Rosetta	Amp / ChlorA	18°C	ü.N.
CrGUN4	pQE80L	Rosetta	Amp / ChlorA	18°C	ü.N.
SynGUN4-AtGUN4 <sup>C</sup>	pQE80L	Rosetta	Amp / ChlorA	18°C	ü.N.
CrGUN4-AtGUN4 <sup>C</sup>	pQE80L	Rosetta	Amp / ChlorA	18°C	ü.N.
AtCHLM	pQE80L	Rosetta	Amp / ChlorA	30°C	3 h
OsCHLH	pet28a	Rosetta	Km / ChlorA	18°C	ü.N.
OsCHLD	pet28a	Rosetta	Km / ChlorA	18°C	ü.N.
OsCHLI	pet28a	BL21	Km	30°C	3 h
OsGUN4	pet28a	Rosetta	Km / ChlorA	30°C	3 h
AtPKU1	pCold/pQE80L	Arctic/BL21	Amp	12°C	ü.N.
AtPKU2	pCold/pQE80L	Arctic/BL21	Amp	12°C	ü.N.
AtPKU3	pCold/pQE80L	Arctic/BL21	Amp	12°C	ü.N.
AtPKU5	pCold/pQE80L	Arctic/BL21	Amp	12°C	ü.N.
AtPKU12	pCold/pQE80L	Arctic/BL21	Amp	12°C	ü.N.
AtPKU13*	pQE80L	Rosetta	Amp / ChlorA	30°C	3 h
AtCKII $\alpha$	pCold	BL21	Amp	15°C	ü.N.

<sup>1</sup> Diese Expressionsbedingungen wurden für alle AtGUN4 Konstrukte (WT, S264I, S264D, verkürzte) verwendet

\*vormals PK17

### 2.8.7.2 Aufreinigung rekombinanter Proteine aus E.coli

Die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte zur Expression rekombinanter Proteine kodieren zusätzlich für einen, der Klonierungsstelle vorangestellten, poly-Histidin-*tag* (6xHis). Damit trugen alle exprimierten Proteine einen N-terminalen 6xHIS-*tag*. Poly-Histidin-Motive haben die Eigenschaft Ni<sup>2+</sup>-Ionen zu binden und waren somit geeignet 6xHIS-*tag* tragende Proteine mittels (Metallchelat-)Affinitätschromatografie aus einem Proteinextrakt anzureichern. Das über den His-*tag* gebundene Protein wurde anschließend mit einem Histidin-Analogon (Imidazol) per Verdrängungsreaktion von der Matrix gelöst. Das Protokoll zur Aufreinigung der rekombinanten Proteine basierte im Wesentlichen auf den Angaben des Handbuchs „*The QIAexpressionist™*“ (Qiagen).

Im ersten Schritt wurde das Bakterienpellet mit 5 ml Lysepuffer / 1 g Zellpellet (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol pH 8,0 + 200 µl Lysozym (Stammlösung: 10 mg/ml) resuspendiert und für 0,5-1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit Ultraschall (Sonoplus-Bandelin: 2 min; Stufe 5; Frequenz 30%) behandelt und für 30 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,3- 1 ml Ni-NTA (Ni- *nitrilotriacetic acid*) Agarose versetzt und für eine Stunde bei 4°C auf einem Rotationsinkubator inkubiert. Eine Säule (Bio-Rad oder Thermo Scientific) wurde mit der Suspension befüllt. Nach dem Absetzen der Matrix wurde die Säule geöffnet und der Durchfluss aufgefangen. Die Matrix wurde mit 8 ml Waschpuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 30 mM Imidazol pH 8,0) gewaschen und anschließend die gebundenen Proteine mit 2 ml Elutionspuffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol pH 8,0, mindestens: 4-faches Volumen der Matrix) eluiert. Alle Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C durchgeführt. Da Imidazol

selbst einen negativen Einfluss auf die Stabilität und Faltung von Proteinen haben kann, wurde dieses durch geeignete Weiterverarbeitung aus der Proteinlösung entfernt (siehe folgender Abschnitt).

### **2.8.7.3 Dialyse, Aufkonzentration, Pufferaustausch und Lagerung**

Ein Teil der in dieser Arbeit aufgereinigten Proteine (rekombinante GUN4) wurden nach der Elution mittels Zentrifugationskonzentratoren (Amicon® Ultra Centrifugal Filters, Merck Millipore) aufkonzentriert. Dabei wurde das Eluat auf ein geringes Volumen (~100 µl) eingengt und mit 4 ml Lysepuffer (ohne Lysozym, siehe 2.8.7.2, S.103) aufgefüllt. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Das finale Volumen wurde proteinspezifisch gewählt.

Ein weiterer Teil rekombinanter Proteine wurde nach der Elution dialysiert. Hierfür wurde das Eluat in einen Dialyseschlauch (SnakeSkin™, Thermo Scientific) überführt und in einem Becherglas mit Dialysepuffer (mindestens 1 l) für 2 h unter leichtem Rühren in der Kühlzelle inkubiert. Nach Austausch des Puffers wurden die Proteine für weitere 12 h dialysiert. Sofern nicht anders angegeben, wurden die rekombinanten Untereinheiten der Mg-Chelatase (OsCHLH, D, I) in PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,5) dialysiert. Die rekombinanten Kinasen wurden in einen Lagerungspuffer (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 5 mM DTT, 5% Glycerol, pH 8,0) überführt.

Mit Ausnahme der aufgereinigten Proteinkinasen wurden alle Proteine auf eine Proteinkonzentration von 1 µg/µl eingestellt (Verdünnung oder Zentrifugationskonzentratoren), mit 5% Glycerin (f.c.) versetzt und in Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Sofern ein weiterer Pufferaustausch notwendig war, wurden Aliquots der aufgereinigten Proteine zusätzlich mit einem Slide-A-Lyzer™ MINI- (Thermo Scientific) oder MF-Millipore Membran-Filter (Merck Millipore) gegen einen weiteren Puffer dialysiert.

Die qualitative und quantitative Kontrolle der rekombinanten Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.8.3, S.98).

### **2.8.8 Aufreinigung des fullGUN4 Antikörpers für eine Immunopräzipitation**

Der *Arabidopsis* GUN4 Antikörper (Peter und Grimm, 2009) wurde aus einem Gesamtserum mittels Dot-Blot-Affinitätsreinigung aufgereinigt und konzentriert. Hierfür wurden 200-300 µg rekombinantes AtGUN4 auf 10-15 Nitrozellulosemembran-Stücke (ca. 0,5x1 cm) getropft. Nach Trocknung wurden die Membranen in 2% Milchpulver in TBST (siehe Abschnitt 2.8.5.2, S.100) für 1 h bei RT geblockt. Die Membranen wurden mit dem Serum (1:5 in Blockpuffer) über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Membranen gewaschen (5x 5 min TBST) und der gebundene

Antikörper sauer eluiert: 0,5 ml Glycinpuffer (0,1 M Glycin; 0,5 M NaCl; pH 2,6) je 2 Membranstücke inkubiert für 2 min bei RT. Das Eluat wurde mit 100 µl 1 M Tris (pH 8) neutralisiert. Im Anschluss wurden die Eluate vereinigt und auf 100-200 µl eingeeengt (Amicon® Ultra Centrifugal Filters, Merck Millipore). Mit diesem Protokoll wurden Antikörperkonzentrationen von 1-1,5 µg/µl erreicht. Die Funktionalität des aufgereinigten Antikörpers wurde mittels Western-Blot gegen *Arabidopsis*-Pflanzenextrakte überprüft.

### 2.8.9 Chloroplastenisolation

Für die Isolation von intakten Chloroplasten wurden Pflanzen des *Arabidopsis* WT (Col-0) vier Wochen auf Erde im Kurztag bei 100 µmol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> angezogen. Pflanzen einer Schale wurden in 500 ml Homogenisierungspuffer (450 mM Sorbitol, 20 mM Tricin, 10 mM EDTA, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,1% BSA (w/v), pH 8,4 mit KOH) in einem modifizierten *Warring Blender* (Kannangara et al., 1977) homogenisiert (2x 4s niedrigste Stufe). Das Homogenat wurde durch eine Lage Miracloth (Merck) in einen Zentrifugenbecher filtriert und die Chloroplasten bei 500xg für 8 min (4°C) (Beschleunigung: Maximum / Bremse: Maximum) pelletiert. Das Pellet wurde in 1 -2 ml 1x Resuspensionpuffer (RB / 300 mM Sorbitol, 20 mM Tricin, 2,5 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>; pH 8,4 mit KOH) aufgenommen und mit einer abgeschnittenen Spitze auf einen Percoll<sup>TM</sup>-Stufengradienten (in Cortex-Röhrchen) appliziert. Der Stufengradient bestand aus einem Kissen von 13 ml 80% Percoll (v/v) (für 30 ml: 24 ml Percoll, 6 ml 5x RB), das mit 12 ml 40% Percoll (v/v) (für 30 ml: 12 ml Percoll, 6 ml 5x RB; 12 ml H<sub>2</sub>O) überschichtet wurde. Der beladene Gradient wurde für 30 min bei 6500xg im *swingout* Rotor bei 4°C (Beschleunigung: Minimum / keine Bremse) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation sammelten sich die Chloroplasten an der Grenzschicht zwischen 80% und 40% Percoll, während die Thylakoide/defekten Chloroplasten nicht in den Gradienten eindringen konnten. Die Bande der Thylakoide wurde verworfen; die intakten Chloroplasten in 20 ml 1x RB überführt, vorsichtig geschwenkt und anschließend erneut zentrifugiert (6 min, 3800xg, Swing-out Rotor, 4°C, Beschleunigung: Minimum, keine Bremse). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Chloroplastenpellet in 500 –1000 µl 1x RB aufgenommen. Alternativ wurden die Chloroplasten in RB-Puffer ohne Sorbitol osmotisch lysiert oder in einem für das Folgeexperiment spezifischen Puffer aufgenommen. Alle Arbeiten wurden zügig in der Kühlzelle, bzw. auf Eis durchgeführt.

## **2.8.10 Größenfraktionierung von plastidären Proteinen und Proteinkomplexen**

Im Rahmen des Versuches die GUN4-Kinase zu identifizieren, wurden zwei verschiedene Strategien verfolgt. Beide Ansätze basieren auf der physikalischen Auftrennung eines *Arabidopsis*-Chloroplastenextraktes in Fraktionen von Proteinen, bzw. Proteinkomplexen, unterschiedlicher Größe. Nach der Auftrennung wurden Aliquots der gewonnenen Fraktionen auf GUN4-Kinaseaktivität überprüft (Abschnitt 2.9.5, S.115). Positiv getestete Fraktionen wurden per Massenspektrometrie auf die enthaltenen Proteine analysiert.

### **2.8.10.1 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) – size exclusion (SEC)**

Die Größenfraktionierung von Proteinen und Proteinkomplexen erfolgte an einem Äkta FPLC-System (Pumpe: P-920; Detektor (UV/VIS): UPC-900; Probensammler: Frac-920) bei 12-14°C (Unichromat 1500 Schrank).

#### **Gießen einer Sephacryl-Säule**

Für die Auftrennung von Plastidenextrakten wurde eine Sephacryl-Säule (S300 HR, ~10-150 kDa Auftrennungsbereich) entsprechend dem Handbuch „Gel Filtration – Principles and Methods“ (Amersham Biociences, ISBN: 18-1022-18) gegossen. Eine XK16/70-Säule (Amersham Biosciences) wurde mit Hilfe eines Adapters gepackt. Nach Abschluss des Gießvorgangs wurde die Säuleneffizienz mit dem sogenannten „Aceton-Test“ (Handbuch „Gel Filtration – Principles and Methods“; Amersham Biociences, ISBN: 18-1022-18) ermittelt. Die eigenhändig erzeugte Säule hatte eine Betthöhe von 42cm mit einem Matrixvolumen von 75ml und circa 12000 theoretischen Böden pro Meter (N). Die Herstellerangaben für typische N-Werte von S300 HR-Säulen liegen bei N>6000 (z.B. GE Healthcare).

#### **Vorbereitung der Chloroplastenextrakte**

Aufgeklärte Chloroplasten (siehe Abschnitt 2.8.9, S.105) wurden in 500µl Puffer (20 mM Tricin, 2,5 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,4 mit KOH) aufgenommen. Die Chloroplastensuspension wurde mit 400 µl SEC-Puffer (20 mM HEPES, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl, 0,05% β-Dodecylmaltosid (β-DM) (w/v), pH 8) und 100 µl 10% β-DM (w/v) (f.c. 1% β-DM (w/v)) versetzt. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Extrakte bei maximaler Geschwindigkeit (4°C) für 30 min zentrifugiert und der Überstand mit SEC-Puffer auf 2 ml aufgefüllt. Abschließend wurde die Proteinkonzentration der solubilisierten Extrakte mittels Bradford-Reagenz (siehe Abschnitt 2.8.2.1, S.98) bestimmt.

#### **Größenfraktionierung**

Für die Größenfraktionierung wurden 1-4 mg (in 2 ml) solubilisiertes Gesamtchloroplastenprotein eingesetzt. Die XK16/42 S300HR- Säule wurde mit 1,5 Säulenvolumen (ca. 100 ml) SEC-Puffer (20 mM HEPES, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl, 0,05% β-DM (w/v), pH 8) äquilibriert. Der Proteinextrakt wurde in

eine 2 ml Probenschleife überführt und anschließend die SEC bei konstanter Flussrate von 0,1 ml / min gestartet. Ein Aliquot der Fraktionen wurde in einem Kinase-Assay (siehe Abschnitt 2.9.5, S.115) auf GUN4-Kinaseaktivität getestet und anschließend positiv getestete Fraktionen per Massenspektrometrie auf enthaltene Kinasen analysiert. Für weitere Analysen (z.B. Western-Blot) wurden die Proteine mit 10% TCA (w/v) (f.c.) gefällt.

#### 2.8.10.2 Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

Eine weitere Methode zur Größenfraktionierung von plastidären Proteinen und deren Komplexe stellte die Auftrennung entlang eines Saccharose-Dichtegradienten (SDG) dar. Hierbei wurde ein kontinuierlicher Saccharosegradient mit solubilisierten Chloroplasten beladen. Während der anschließenden Ultrazentrifugation trennten sich die Proteine bzw. Proteinkomplexe entsprechend ihrer Molekularmasse im Gradienten auf. Im Rahmen dieser Arbeit kam ein 12 ml Saccharosegradient von 22,5- 5% zum Einsatz.

##### Gießen des Saccharosegradienten

Der Gradient wurde in acht Schritten als Stufengradient gegossen (siehe Tabelle XVII). Zwischen jeder Stufe wurde der Gradient bei -20°C eingefroren und so die vorhergehende Stufe stabilisiert. Zwei bis drei Stunden vor der Ultrazentrifugation wurde der Gradient erschütterungsfrei aufgetaut. Während des Auftauprozesses bildete sich der kontinuierliche Gradient aus.

Für das Gießen des Gradienten wurde eine 25%ige Saccharoselösung in Gradientenpuffer (20 mM Tricin, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaCl, 5% Glycerol (v/v), pH 8,4 mit KOH) hergestellt. Aus einer 10%igen  $\beta$ -Dodecylmaltosid (DM) Stammlösung wurde eine finale Konzentration von 0,02% DM eingestellt. Zum Erreichen unterschiedlicher Saccharose Konzentrationen wurde die 25%ige Saccharoselösung entsprechend der Tabelle XVII mit Gradientenpuffer verdünnt. Je Stufe wurden 1,5 ml der jeweiligen Konzentration in das Zentrifugenröhrchen überführt.

**Tabelle XVII: Herstellung von Saccharoselösungen unterschiedlicher Konzentration.**

Sowohl die Saccharosestammlösung, als auch der Gradientenpuffer wurden mit 0,02%  $\beta$ -Dodecylmaltosid versetzt

Konzentration (% f.c.)	25% Saccharose (ml)	1x Gradientenpuffer (ml)
22,5	4,5	0,5
20	4	1,0
17,5	3,5	1,5
15	3	2,0
12,5	2,5	2,5
10	2	3,0
7,5	1,5	3,5
5	1	4,0

### **Vorbereitung der Chloroplasten**

Die zuvor isolierten Chloroplasten wurden in Gradientenpuffer (mit 0,2% DM) aufgenommen und auf eine Konzentration von 1 mg Chlorophyll/ ml eingestellt. Die Solubilisierung der membranständigen Proteine erfolgte durch Zugabe von 1% DM und Inkubation auf Eis für 15 min. Die solubilisierten Extrakte wurden anschließend für 20 min zentrifugiert (4°C, maximale Geschwindigkeit) und 1 ml auf den vorbereiteten Gradienten pipettiert.

### **Gradientenzentrifugation**

Die Gradienten wurden für 16 h bei 160.000xg (4°C) in einem *swingout* Rotor (SW49Ti) in einer Beckmann Optima-XE90 Zentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurden mit Hilfe einer langen Kanüle, angeschlossen an eine peristaltische Pumpe, 500 µl Fraktionen vom Boden des Gradienten abgesaugt. Ein Teil jeder Fraktion wurde auf GUN4-Kinaseaktivität überprüft (Abschnitt 2.9.5, S.115). Der verbleibende Teil wurde für die spätere massenspektrometrische Analyse bei -20°C gelagert.

### **2.8.11 Massenspektrometrische Analyse von Proteinen**

Die massenspektrometrische Analyse von Proteinen unterschiedlicher Quellen (Größenausschlusschromatografie, Saccharose-Gradient, u.w.) wurde in der Arbeitsgruppe von Sacha Baginsky (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt (Rodiger et al., 2014). Als Ausgangsmaterial dienten entweder präzipitierte Proteinextrakte oder ausgeschnittene SDS-PAGE Gelfragmente.

### **2.8.12 Bindungsstudien**

#### **2.8.12.1 Tryptophan-Quenching Analyse**

Die Porphyrinbindung von GUN4 wurde mittels Tryptophan-Quenching Analyse untersucht. In Anlehnung an das Protokoll von Karger et al. (2001) wurde eine 0,5 µM GUN4-Lösung (in Quenchingpuffer: 50 mM Tricin, 300 mM Glycerol, 1 mM DTT, pH 7,9) schrittweise mit steigenden Konzentrationen von Porphyrinen (ProtoIX oder MgP) inkubiert und die Abnahme der Tryptophanfluoreszenz am Spektralphotometer (Hitachi F-7000) ermittelt. Die Porphyrine (10 mM Stammlösung in DMSO) wurden mit Quenchingpuffer auf eine Konzentration von 1 mM verdünnt. Es wurden Porphyrinkonzentrationen zwischen 0 und 20 µM untersucht. Nach der Zugabe der Porphyrine, jedoch vor der anschließenden Messung, erfolgte eine zweiminütige Inkubation (Einstellen des Gleichgewichtes). Die Parameter des Fluoreszenzphotometers wurden wie folgt gewählt: Anregung: 280 nm, Emission 300-380 nm (Tryptophan-Emissionspeak: ca. 340 nm), Scangeschwindigkeit: 240 nm/ min, Anregungsspalt: 2,5-5 nm, Emissionsspalt: 2,5 nm.



Als Maß für die Affinität wurde die apparente Dissoziationskonstante ( $K_d$ ), welcher der Ligandenkonzentration entsprach bei der 50% der vorhandenen GUN4-Moleküle eine Bindung zum Porphyrin eingegangen waren, bestimmt. Zum einen wurde der  $K_d$  als negatives Reziprok aus der Steigung einer linearen Regression ( $-1/m$ ) der ermittelten Fluoreszenzabnahme aufgetragen als  $\Delta F = F(c_0) - F(c_x)$  (Abzisse) gegen  $\Delta F/c_x$  (Ordinate) ermittelt. Wobei  $F$  der Fluoreszenz,  $F(c_0)$  der Fluoreszenz ohne Ligand,  $F(c_x)$  der Fluoreszenz nach Zugabe einer Ligandenkonzentration  $C_x$  und  $m$  der Steigung der linearen Regression entspricht. Zum anderen erfolgte die Bestimmung, bzw. Überprüfung der  $K_d$ -Werte mittels nicht-linearer Regression mit einer theoretischen Bindestelle (GraphPad Prism 6).

#### 2.8.12.2 Bindungsstudien mit biotinylierten GUN4 und CHLH

Mit diesem Experiment sollte die Bindung der Mg-Chelatase H Untereinheit (CHLH) an GUN4-Proteine untersucht werden. Hierbei kamen rekombinantes *Arabidopsis* GUN4 (biotinyliert) und Reis CHLH zum Einsatz.

##### Biotinylierung rekombinanter Proteine

Für ein *in vitro* Pulldown-Experiment mit rekombinantem AtGUN4 und OsCHLH wurde rekombinantes GUN4 mit Biotin markiert. Für die Markierung wurde das EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin Kit (Thermo Scientific), welches Biotin an primäre Amine knüpft, verwendet. Zweihundert  $\mu$ l einer Lösung mit 3,3  $\mu$ g/ $\mu$ l GUN4 (in PBS/ Abschnitt 2.8.7, S.101) wurden entsprechend den Angaben des Herstellers mit Biotin markiert. Überschüssiges Biotin wurde durch Dialyse (SlideALyzer, Thermo Scientific) gegen PBS entfernt. Die erfolgreiche Markierung wurde mittels SDS-PAGE und Western-Blot überprüft (Veränderung des Migrationsverhaltens biotinylierter Proteine) und eine Konzentrationsabschätzung vorgenommen.

Das biotinylierte GUN4 (bio-GUN4) wurde an magnetische Partikel, konjugiert mit Streptavidin (Dynabeads, Dynal Biotech M280 Streptavidin), gekoppelt. Hierfür wurden 40  $\mu$ l Dynabeads, zuvor gewaschen mit PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,5), mit 5,5  $\mu$ g bio-GUN4 und 60  $\mu$ l PBS für 30 min bei RT auf einem Rollinkubator inkubiert. Anschließend wurden die magnetischen Partikel 4x mit 200  $\mu$ l PBS gewaschen (Magnetständer), in PBS resuspendiert und mit 30, bzw. 15  $\mu$ l CHLH (1  $\mu$ g/ $\mu$ l) versetzt. Nach zweistündiger Inkubation (RT, Rollinkubator) wurden die Dynabeads 3x mit 300  $\mu$ l PBS gewaschen, mit 60  $\mu$ l 1x SDS-PAGE Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Eluate wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

#### 2.8.12.3 Microscale thermophoresis und Schmelzpunktbestimmung von Proteinen

Zur quantitativen Analyse der Bindungskonstanten der GUN4-CHLH-Interaktion wurde die Technik der *microscale thermophoresis* angewendet. Die Messung erfolgte in Kooperation mit der

Targenomix GmbH (Potsdam-Golm). Die verwendeten Proteine AtGUN4(WT), AtGUN4(S264D) lagen in Lysepuffer mit 5% Glycerin (siehe Abschnitt 2.8.7.2, S.103) und OsCHLH in PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,5) vor. Das CHLH-Protein wurde mit dem MiDye650 Succinimidyl Ester-Kit (IRIS biotech) mit einem Fluoreszenzfarbstoff an primären Aminen markiert. Nach dem Entfernen des überschüssigen Fluoreszenzfarbstoffes durch die Nutzung einer PD-25 Säule wurde die CHLH-Konzentration auf 0,375 µM eingestellt. Die GUN4-Proteine hatten eine Ausgangskonzentration von 50 µM. Die Bestimmung der Bindungskonstante erfolgte bei konstanter Menge CHLH (93 nM) und variabler GUN4-Konzentration 31 µM – 15 nM. Die Reaktionsansätze wurden in MO-K002 Monolith™ NT.115 *standard treated capillaries* (nanotemper) überführt. Die Messparameter der MST Monolith NT.115 Nano-BLUE/RED (nanotemper) wurden wie folgt gewählt: 100% LED-Power, 40%MST (20s mit 5s vor und nach der MST-Messung).

Die strukturelle Integrität des GUN4(WT) und GUN4(S264D) Proteins wurde am nanoDSF: Prometheus NT.48 (PR001) mit PR-C002 Prometheus NT.48 Series nanoDSF *grade standard capillaries* (nanotemper) bestimmt. Die Messung basiert im Wesentlichen auf der Bestimmung des Schmelzpunktes der rekombinanten Proteine im Verlauf eines Temperaturgradienten (20-80°C) durch Veränderung der Intensität und des Verhältnisses der Tryptophan-Fluoreszenzmaxima von 330 nm (gefaltet) zu 350 nm (entfaltet). Die Berechnung der Schmelztemperatur erfolgte durch die Analysesoftware.

### **2.8.13 Immunopräzipitation (IP) von GUN4 aus Pflanzenextrakten**

Der phosphorylierungsspezifische GUN4 Antikörper (siehe Abschnitt 2.8.6, S.101) konnte nicht für die Analyse des *in vivo* Phosphorylierungszustandes von GUN4 genutzt werden. Mit diesem Experiment sollte daher der Versuch unternommen werden den *in vivo* Phosphorylierungszustand durch Anreicherung des GUN4 aus Pflanzenextrakten nachzuweisen. Hierbei wurde ein *Arabidopsis*-Extrakt erstellt und kurzzeitig mit ATP inkubiert (Kinaseassay). Anschließend wurde das GUN4 mittels IP aus dem Extrakt aufgereinigt und der Phosphorylierungsgrad mittels Western-Blot analysiert (pGUN4-Antikörper).

Die IP von GUN4 aus At Pflanzenextrakten erfolgte mit dem aufgereinigten GUN4 Antikörper (siehe Abschnitt 2.8.8, S.104). At Pflanzen einer Schale (4 Wochen, Kurztag, 100 µmol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) wurden in 500 ml Homogenisierungspuffer (450 mM Sorbitol, 20 mM Tricin, 10 mM EDTA, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,1% BSA (w/v), pH 8,4 mit KOH) homogenisiert und durch eine Lage Miracloth filtriert. Die Suspension wurde für 8 min bei 500 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in Kinaseassaypuffer (KAP) (50 mM HEPES, 100 mM Sorbitol, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM NaCl, 1 mM ATP, Roche cOmplete Protease Inhibitor Tablette, pH 7,6) resuspendiert. Der gewonnene Extrakt wurde zu

250 µl (i.d.R. 500 - 800 µg Protein) aliquotiert und unter den experimentspezifischen Bedingungen inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl IP-Puffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 % (v/v) NP-40, pH 7,5) und 25 µl aufgereinigtem GUN4 Antikörper wurden die Extrakte für 1 h bei 4°C inkubiert (Bildung des GUN4-IgG Komplexes).

Im Anschluss wurden 50 µl SiMAG-Protein G magnetic beads (chemicell GmbH), die zuvor mit IP-Puffer gewaschen wurden, hinzugefügt und das Gemisch erneut für 1 h bei 4°C inkubiert (Bindung Antigen-Antikörper-Komplex an Protein G). Zur Sammlung der magnetischen Partikel wurden die Reaktionsgefäße auf einen Magnetständer gestellt. Der Überstand wurde abgenommen und mit Ladepuffer versetzt. Die *beads* wurden dreimal mit 700 µl IP-Puffer gewaschen. Die finale Elution des Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgte mit 50 µl Elutionspuffer (IP-Puffer + 0,1 M Glycin, pH 2,8) für 10 min bei RT unter leichtem Schütteln. 40 µl des Eluates wurden mit 2 µl 1 M NaOH neutralisiert, mit Ladepuffer versetzt, erhitzt (5 min 95°C) und mittels Western-Blot analysiert.

#### 2.8.14 GFP-Lokalisationsstudien

Für die subzelluläre Lokalisierung von Proteinen wurden *full length* cDNA-Fragmente in den pCK205 Vektor, welcher für ein C-terminales GFP-Fusionsprotein kodiert, kloniert und transient in Blätter von *Nicotiana bethamiana* exprimiert (siehe Abschnitt 2.7.4.4, S.97). Das GFP-Fluoreszenzsignal wurde am Leica TCS SP2 Mikroskop (Anregung: 488 nm / Emission: 495-515 nm (GFP) und 600-700 nm (Chlorophyll)) detektiert.

## 2.9 Bestimmung von Enzymaktivitäten

### 2.9.1 ALA-synthese

Die Bestimmung der 5-Aminolävulinsäuresyntheserate in Blattgewebe basierte auf dem Protokoll von Mauzerall und Granick (1956). Hierbei wurde die Hemmung der ALA-DEHYDRATASE (ALAD) durch Lävulinat, einem Substratanalogon für ALA, genutzt. Das akkumulierende ALA wird anschließend mit Ethylacetoacetat (EAA) zu einem Pyrrol mit freier α-Position umgesetzt, das mit Ehrlich's Reagenz einen Farbkomplex bildet.

50- 100 mg Pflanzenmaterial wurden geerntet und in Lävulinat-Inkubationspuffer (20 mM TRIS/HCl, 40 mM Lävulinat, pH 7,2) für die experimentspezifischen Zeiten bei 100-120 µmol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Pflanzenmaterial entnommen, mit Filterpapier getrocknet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Blattmaterial wurde in 1 ml 20 mM Phosphatpuffer (20 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,8) homogenisiert. Das Homogenat wurde 10 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit (4°C) zentrifugiert und 400 µl des Überstandes mit 100 µl

Ethylacetoacetat (EAA) versetzt, für 10 Minuten bei 95°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. 500 µl frisches Ehrlich's Reagenz (500 ml bestehen aus: 373 ml Eisessig, 90 ml 70 % Perchlorsäure, 37 ml Wasser und 1,55 g HgCl<sub>2</sub>, 2 g DMABA pro 110 ml) wurde hinzugegeben, erneut 5 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert (RT) und anschließend die Extinktion bei 553 nm bestimmt. Die Streuung, bestimmt bei 720 nm, wurde von allen Extinktionen subtrahiert. Die Berechnung der gebildeten ALA erfolgte mittels ALA-Standardkurve: Extinktionskoeffizient( $\epsilon_{\text{ALA}}$ ) bei 553 nm = 0,0172 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

## 2.9.2 Mg-Chelatase Aktivität

### 2.9.2.1 Rekombinant

Die Aktivität rekombinanter Reis MgCh-Untereinheiten wurde in Anlehnung an das Protokoll von Zhou et al. (2012) durchgeführt. Der Reaktionspuffer setzte sich wie folgt zusammen (Assaypuffer (AP)): 50 mM Tricin/KOH, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 1 mM ATP und 5 µM ProtoIX (20 mM Stammlösung in DMSO), pH 8). Die zuvor in *E.coli* exprimierten und aufgereinigten Untereinheiten wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt (in Klammern ist die eingesetzte Menge in 150 µl Assayansatz angegeben): 2,5 µM OsCHLH (45 µg), 2,5 µM At/Os/Syn/CrGUN4 (At: 8,25 µg), 1 µM OsCHLD (10,5 µg), 1 µM CHLI (6 µg). Entsprechend den Empfehlungen von Zhou et al. (2012) wurden OsCHLH, GUN4, ProtoIX sowie OsCHLD und OsCHLI für 20 min auf Eis vorinkubiert (in AP), anschließend für 5 min bei 30°C erwärmt, gemischt und in eine 96-well-Platte überführt. Die Bildung des MgP wurde in einem kontinuierlichen Assay am Fluoreszenzphotometer (Hitachi F7000), ausgestattet mit einem 96-well-Plattenleser, verfolgt. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen wurden auf 416 nm beziehungsweise 595 nm eingestellt (Anregungsspalt: 5 nm/ Emissionsspalt: 10 nm). Die Menge an gebildeten MgP wurde mit einer MgP-Standardkurve berechnet.

### 2.9.2.2 Pflanzenextrakte

*In vivo* MgCh-Aktivität wurde in Extrakten von 21-Tage alten *Arabidopsis* Pflanzen, gewachsen im Kurztag bei 100-120 µmol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, bestimmt. Das Pflanzengewebe wurde in Homogenisierungspuffer (0,4 M Sorbitol, 20 mM Tricine-KOH, 20 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM DTT, pH 8) mit Mörser und Pistill homogenisiert, durch eine Lage Miracloth filtriert und anschließend bei 500xg für 8 min (4°C) zentrifugiert. Das Pellet wurde in Assaypuffer (AP: 0,3 M sorbitol, 20 mM Tricine-KOH, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, pH 8, Roche cComplete Protease Inhibitor Tablette) resuspendiert. Der Assay wurde durch Zugabe eines gleichen Teiles AP, versetzt mit 10 µM ProtoIX, 10 mM ATP, 1 mM DTT und 25 mM MgCl<sub>2</sub>, gestartet. Die Assay-Ansätze wurden bei 30°C für die experimentspezifischen Zeitpunkte inkubiert und je 100 µl des Assayansatzes mit 500 µl Aceton:0,2 M NH<sub>4</sub>OH (9:1 v/v) abgestoppt, das gebildete MgP extrahiert und per HPLC quantifiziert.

### 2.9.3 MgP-Methyltransferase-Aktivität

#### 2.9.3.1 Rekombinant

Die Bestimmung der MgP-Methyltransferase-Aktivität von rekombinantem CHLM Protein erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Shepherd und Hunter (2004). Der Aktivitätsnachweis wurde in Assay-Puffer (100 mM TRIS/HCl, 500  $\mu$ M S-Adenosylmethionin (Sigma), 20  $\mu$ M MgP (Frontier Scientific), pH 7) durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe des rekombinanten Enzyms (0,6  $\mu$ M f.c.) zum vorgewärmten Assay-Puffer (30°C) gestartet. Die Reaktionsansätze wurden bei 30°C inkubiert und zu experimentspezifischen Zeitpunkten ein Aliquot entnommen, das anschließend mit 500  $\mu$ l basischem Aceton (Aceton:0,2 N NH<sub>4</sub>OH, 9:1, (v/v)) gemischt wurde. Die Bestimmung des gebildeten MgPMME erfolgte mittels HPLC.

#### 2.9.3.2 Pflanzenextrakte

Die Pflanzenextrakte zur Bestimmung der MgP-Methyltransferase-Aktivität wurden wie im Abschnitt 2.9.2.2 (S.112) beschreiben hergestellt und das Pellet in Assaypuffer (0,3 mM Sorbitol, 20 mM Tricin-KOH, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8). Die Reaktion wurde durch Zugabe von einem Teil Assaypuffer, versetzt mit 1000  $\mu$ M S-Adenosylmethionin (Sigma) und 40  $\mu$ M MgP (Frontier Scientific), gestartet. Die Assay-Ansätze wurden bei 30°C für die experimentspezifischen Zeitpunkte inkubiert und je Zeitpunkt 100  $\mu$ l Assaymix mit 500  $\mu$ l Aceton:0,2 M NH<sub>4</sub>OH (9:1 v/v) abgestoppt, das gebildete MgPMME extrahiert und per HPLC quantifiziert.

### 2.9.4 Phosphorylierungsassay für GUN4 mit Extrakten von *Synechocystis*, *Chlamydomonas* und *Arabidopsis*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Phosphorylierung von rekombinantem GUN4 mit Hilfe von Extrakten von *Arabidopsis* Genotypen untersucht. Zu Beginn wurde ein Kinase-Assay entwickelt, der auf der Nutzung von aufgereinigten Chloroplasten- bzw. *crude extracts* (schnelle Isolation von Chloroplasten und Thylakoidmembranen ohne anschließende Aufreinigung der Chloroplasten) basierte. In beiden Fällen waren mehrere Gramm Blattmaterial erforderlich (für den Assay mit *crude extracts* 5-6 ausgewachsene At-Pflanzen im Rosettenstadium (ca. 6 Wochen alt). Im weiteren Verlauf der Analysen wurde es notwendig einen Kinaseassay zu entwickeln, der es erlaubte eine Vielzahl von unterschiedlichen Genotypen oder Behandlungen (z.B. unterschiedliche Lichtintensitäten) parallel zu analysieren. Im Gegensatz zur aufwendigeren Präparation von Chloroplasten oder *crude extracts* kamen bei diesem *one leaf* Kinaseassay lediglich wenige Milligramm (30- 100 mg) Blattmaterial zum Einsatz. Dies entsprach in etwa fünf 14-Tage alte At-Pflanzen oder 1-2 Blättern einer ausgewachsenen At-Pflanze (Rosettenstadium). Wurden diese Art von Assays zunächst mit frischem

Blattmaterial durchgeführt, zeigte sich, dass die Aktivität der GUN4-Kinase auch in gefrorenem Blattmaterial erhalten blieb.

Zusätzlich zur Analyse in Pflanzenextrakten wurde die Aktivität der GUN4-Kinase in Gesamtzellextrakten von *Synechocystis* sp. PCC 6803 und *Chlamydomonas reinhardtii* CC-3395 untersucht. Die geernteten Zellpellets wurden ebenfalls in Kinaseassaypuffer (ohne ATP) resuspendiert. *Synechocystis*-Zellen wurden durch Ultraschall (5x1min, 30%, auf Eis) aufgeschlossen. Der *Chlamydomonas*-Extrakt wurde mehrmals durch eine Kanüle gedrückt.

Unabhängig von der Art des durchgeführten Kinaseassays wurden im Wesentlichen folgende Schritte durchgeführt: Zunächst wurde das Blattmaterial in Homogenisierungspuffer (50 mM HEPES, 330 mM Sorbitol, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, pH 7.6/ Bellafiore et al. (2005)) aufgeschlossen. Der Aufschluss erfolgte mittels Warring-Blender, Mörser und Pistill oder - im Falle des *one leaf* Kinaseassay - mit Stahlkugel und Schwingmühle. Anschließend wurden die Extrakte durch eine Lage Miracloth gefiltert und für 5 min bei 2000xg zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde in 0.5- 1 ml (*crude extract*) oder 50- 100 µl (*one leaf*) Kinaseassaypuffer (KAP) ohne ATP (50 mM HEPES, 100 mM Sorbitol, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM NaCl, Roche cOmplete Protease Inhibitor Tablette, pH 7,6) aufgenommen. Aufgereinigte Chloroplasten (Abschnitt 2.8.9, S.105) wurden ebenfalls in KAP resuspendiert. Für alle gewonnenen Extrakte wurde der Chlorophyll- (Abschnitt 2.4.3, S.81) und Proteingehalt (Abschnitt 2.8.2.1, S.98) ermittelt.

Ein Kinaseassayansatz (50 µl) enthielt: Pflanzenextrakt entsprechend 10 µg Chlorophyll (i.d.R. ca. 5- 10 µl), 5 µg rekombinantes GUN4, 25 µl KAP mit ATP (finale Konzentration: 1 mM ATP oder 0,4 mM ATP und 5µCi radioaktiv markiertes γP<sup>32</sup>-ATP). Im Falle des Vergleiches von Mutanten mit reduziertem Chlorophyllgehalt oder beim Vergleich von *Synechocystis*-, *Chlamydomonas*- und *Arabidopsis*-Extrakten wurden gleiche Mengen an Protein eingesetzt (Menge an Protein die in einem Volumen entsprechend 10 µg Chlorophyll des Kontrolleextraktes enthalten war). Die Proben wurden für die experimentspezifischen Zeiträume (i.d.R. 30 min) bei 30°C (Wasserbad) im Licht (ca. 100 µmol Photonen m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> / externe Lichtquelle) oder Dunkelheit (Alufolie) inkubiert. Für bestimmte Fragestellungen wurden die Proben im Anschluss an den Assay für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit (RT) zentrifugiert und so der Assayansatz in eine lösliche (Überstand) und membranhaltige (Pellet) Fraktion aufgetrennt. Die gewonnen Fraktionen wurden mit Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Analyse der GUN4-Phosphorylierung erfolgte nach SDS-PAGE mittels phosphospezifischem pGUN4-Antikörper (Westernblot) oder durch Detektion des radioaktiven Signals mittels Phosphoimagerscreen (Fujifilm) am Phosphoimager (Biorad).

Den Assayansätzen wurden wahlweise 1 mM DTT, 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10 µM ProtoIX, 10 µM MgP, 10 µM Hemin, 2% (v/v) PPase Inhibitor Cocktail II (Sigma) oder 2% (v/v) HALT PPase Inhibitor Mix (Thermo Fisher Scientific) hinzugefügt.

### 2.9.5 GUN4-Kinaseassay mit Fraktionen der Größenausschlusschromatographie und Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

Zur Identifizierung der GUN4-Kinase wurden Fraktionen der Größenausschlusschromatographie (SEC / Abschnitt 2.8.10.1, S.106) und Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation (SDG / Abschnitt 2.8.10.2, S.107) in einem Kinaseassay mit rekombinantem GUN4 als Substrat analysiert. Der Kinaseassay wurde analog zum Protokoll in Abschnitt 2.9.4 (S.113) mit KAP (1 mM ATP und 1 mM DTT) durchgeführt.

Für die Fraktionen der SDG wurden 50 µl der jeweiligen Fraktion mit 5 µg GUN4 in KAP (finales Volumen 100 µl) gemischt. Je 200 µl zweier Fraktionen der SEC wurden vereinigt und kombiniert analysiert. Zu den Fraktionen der SEC wurden 5 µg rekombinantes GUN4-Protein und 40 µl 10x KAP hinzugegeben (finales Volumen 500 µl). Die Assayansätze wurden für 30 min bei 30°C inkubiert (abgedunkelt). Die SDG-Proben wurden nach dem Assay direkt mit Ladepuffer versetzt. Die SEC Proben wurden im Anschluss mit 10% TCA für 20 min auf Eis gefällt und durch Zentrifugation (15 min, 4°C maximale Geschwindigkeit) präzipitiert. Die Pellets wurden in 45 µl 0,1 M NaOH resuspendiert, mit Ladepuffer versetzt und mittels Western-Blot (pGUN4-Antikörper) analysiert.

Fraktionen des Saccharosegradienten, die eine GUN4-Kinaseaktivität aufwiesen, wurden anschließend per Massenspektrometrie analysiert (siehe Abschnitt 2.8.11, S.108). Hierfür wurden die SDG-Proben in einem SDS-Gel kurz aufgetrennt und die Gelstücke ausgeschnitten. Die Proben der SEC aus dem *low molecular weight* Bereich wurden zunächst vereinigt (Fraktion 132-147 / je 200 µl) und auf 130 µl eingengt. Dieses Konzentrat und die Proben aus dem *high molecular weight* Bereich (Fraktion 74 und 75 / 200 µl) wurden mit dem 4-fachen Volumen 100% Aceton für 1 h bei -20°C gefällt und durch Zentrifugation (15 min, 4°C maximale Geschwindigkeit) präzipitiert.

### 2.9.6 Kinaseassay mit rekombinanten Kinasen

Die rekombinanten Kinasen wurden aufgereinigt und in einen Lagerungspuffer (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 5 mM DTT, 5% Glycerol, pH 8) dialysiert.

Zur Überprüfung einer allgemeinen Proteinkinaseaktivität der rekombinanten Kinasen wurden diese mit hitzeinaktivierten Chloroplastenextrakten in Anwesenheit von radioaktiv markiertem ATP inkubiert. Ein Assayansatz (50 µl) enthielt: bis zu 5 µg rekombinante Kinase, 60 µg hitzeinaktiviertes

Chloroplastenprotein (10 min 95°C), 5 µl 10x Kinaseassaypuffer II (KAP II/ 500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM NaCl, pH 7,5), A. dest auf 50 µl. Die Assayansätze wurden für 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von Ladepuffer gestoppt, die Ansätze erhitzt (5 min 95°C) und mittels SDS-PAGE analysiert. Die gefärbten und getrockneten Gele wurden mit einem Phosphoimagerscreen (Fujifilm) am Phosphoimager (Biorad) detektiert.

Zur spezifischen Überprüfung, ob GUN4 ein Substrat dieser rekombinanten Kinasen war, wurden den Assayansätzen anstelle von Chloroplastenprotein, rekombinantes GUN4 (5 µg/ 50 µl) hinzugefügt.

## **2.10 Computergestützte Analysen**

### **2.10.1 Ermittlung der Länge des GUN4 C-Terminus**

Zur automatisierten Ermittlung der Länge des GUN4 C-Terminus in Proteinsequenzen unterschiedlicher Spezies wurde ein Phyton-Algorithmus in Zusammenarbeit mit Dr. C. Fufezan (Uni Münster) erarbeitet. Aus einer vorangegangenen Sequenzanalyse wurde deutlich, dass alle bekannten GUN4 Proteine (bzw. Homologe) einen hochkonservierten Bereich am C-Terminus aufweisen. Das Motif „LRGXXXXXXXXHP“ bildet das Ende der konservierten 8. Helix der GUN4-Kerndomäne in allen untersuchten Organismen.

Zur Erzeugung des Input-Datensatzes wurde eine BLAST-Suche mit der UniProtKB/Swissprot Datenbank und einem weiteren hochkonservierten Peptid von GUN4 („DLIAIDDLWKQYSSNRFGYSVQKRLW“) als Input durchgeführt. Die erhaltenen 84 Sequenzen und deren Spezieszuordnung wurden als FASTA-Dokument exportiert (Stand Juni 2015).

Der Phyton-Algorithmus (Dr. C. Fufezan, Uni Münster) führte eine Suche nach dem „LRGXXXXXXXXHP“ Peptid durch und zählte die Anzahl der nach dem „HP“-Motiv vorhandenen Aminosäuren. Gleichzeitig wurde geprüft, ob sich innerhalb der letzten 5 Aminosäuren eine phosphorylierbare Aminosäure (Serin oder Threonin) befand.

Der Output der Zählung wurde anschließend in einem phylogenetischen Stammbaum geclustert (NCBI Taxonomy-Browser) und grafisch aufgearbeitet (FigTree, Adobe Illustrator).



### 2.10.2 Bildbearbeitung und grafische Auswertung

Die Bearbeitung von Bilddateien (Western-Blots, Proteingele, Fotografien u.a.) erfolgte mit der Adobe Creative Suite 5 (Photoshop, Illustrator, Indesign).

Western-Blot-Signale wurden mit der Aidalmager Software (Raytest; V. 3.52) densitometrisch quantifiziert.

Die grafische Darstellung von Messergebnissen erfolgte mit Graph Pad Prism 6.0 ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Die Ausgabe von Dezimalzahlen erfolgt bei Prism ausschließlich mittels Punkt als Dezimaltrennzeichen. Anders als für den deutschen Sprachraum üblich, werden daher die Dezimalzahlen der gezeigten Grafiken mit einem Punkt, anstatt Komma getrennt.

### 2.10.3 Datenbanken und Online-Ressourcen

Die in dieser Arbeit verwendeten Ressourcen sind in Tabelle XVIII aufgelistet.

Tabelle XVIII: Verwendete Datenbanken, Software und Online-Ressourcen. DB = database.		
Ressource	Verwendung	Link
NCBI	Literaturrecherche, DNA- und Proteinsequenzen, BLAST-Analyse	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
TAIR	<i>Arabidopsis</i> Informationsdatenbank, DNA- und Proteinsequenzen, BLAST-Analyse	<a href="https://www.arabidopsis.org">https://www.arabidopsis.org</a>
Genvestigator	Co-Expressionsanalysen	<a href="https://genevestigator.com/gv">https://genevestigator.com/gv</a>
Expression Angler	Co-Expressionsanalysen	<a href="http://bar.utoronto.ca/ExpressionAngler">http://bar.utoronto.ca/ExpressionAngler</a>
ExPASy	Ressource für bioinformatische Analysen	<a href="http://web.expasy.org">http://web.expasy.org</a>
UniProt/Swiss-Prot	manuell kuriierte Proteinsequenzdatenbank	<a href="http://www.uniprot.org">http://www.uniprot.org</a>
T-DNA Express	Datenbank für <i>Arabidopsis</i> (T-DNA Insertions-) Mutanten	<a href="http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress">http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress</a>
RIKEN <i>Arabidopsis</i> Phenome Information DB	Datenbank mit Genotyp-Phänotyp Analyse von <i>Arabidopsis</i> -Mutanten	<a href="http://rarge.psc.riken.jp/phenome">http://rarge.psc.riken.jp/phenome</a>
Chloroplast 2010 / Chloroplast Phenomics	Datenbank mit Genotyp-Phänotyp Analyse von <i>Arabidopsis</i> -Mutanten	<a href="http://bioinfo.bch.msu.edu/2010_LIMS">http://bioinfo.bch.msu.edu/2010_LIMS</a>
Chloroplast Function DB II	Datenbank mit Genotyp-Phänotyp Analyse von <i>Arabidopsis</i> -Mutanten	<a href="http://rarge.psc.riken.jp/chloroplast">http://rarge.psc.riken.jp/chloroplast</a>
PhosPhat4.0	Datenbank zur Proteinphosphorylierung in <i>Arabidopsis</i>	<a href="http://phosphat.uni-hohenheim.de/db.html">http://phosphat.uni-hohenheim.de/db.html</a>
SUBA III	Vorhersage der subzellulären Lokalisation eines Proteins (Pflanzen)	<a href="http://suba3.plantenergy.uwa.edu.au">http://suba3.plantenergy.uwa.edu.au</a>
ChloroP	Vorhersage der der Länge eines Transitpeptides	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP">http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP</a>
Phyre <sup>2</sup>	Vorhersage der Tertiärstruktur von Proteinen	<a href="http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2">www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2</a>
PredictProtein	Vorhersage von Protein-Protein Interaktionsflächen	<a href="https://www.predictprotein.org/">https://www.predictprotein.org/</a>
WebLogo3	Webseite zur Erstellung von Alignments mit Zuordnung der chemischen Eigenschaften von Aminosäuren	<a href="http://weblogo.threeplusone.com/create.cgi">http://weblogo.threeplusone.com/create.cgi</a>
PyMol	Visualisierung von Tertiärstrukturen	<a href="https://www.pymol.org">https://www.pymol.org</a>
Perl Primer	Software zur Erstellung von (q)PCR Primern	<a href="http://perlprimer.sourceforge.net">http://perlprimer.sourceforge.net</a>
Chromas lite	Auswertung von Sequenzierungsergebnissen	<a href="http://technelysium.com.au/wp/chromas">http://technelysium.com.au/wp/chromas</a>
FigTree	Darstellung phylogenetischer Stammbäume	<a href="http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree">http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree</a>



## 3 Ergebnisse

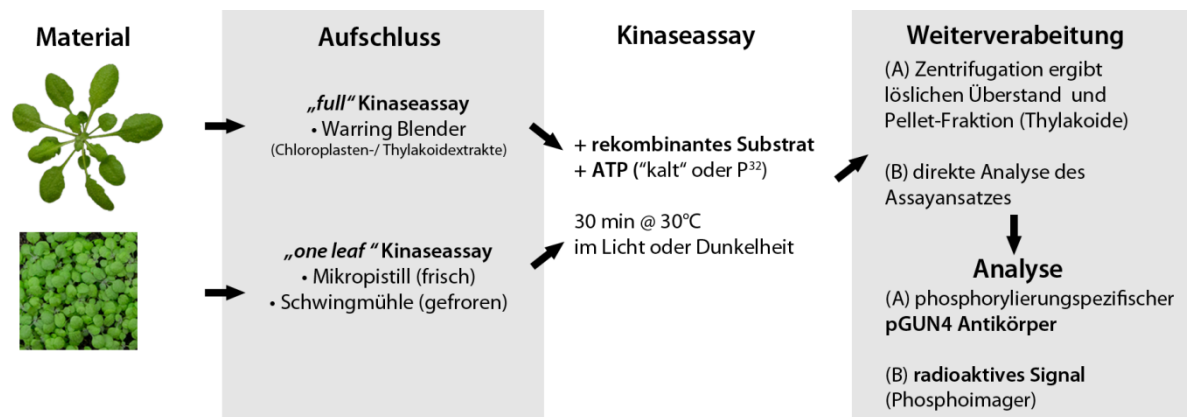
### 3.1 Untersuchungen zur *in vitro* Phosphorylierung von GUN4

#### 3.1.1 Entwicklung eines Kinaseassay für rekombinante Proteine

Um die GUN4-Phosphorylierung und die sie beeinflussenden Faktoren ausführlich studieren zu können, wurde ein *in vitro* Kinaseassay entwickelt (Abbildung 3.1). Die Anwesenheit der GUN4-Kinase (GUK) in Extrakten von Pflanzen wie zum Beispiel *Arabidopsis thaliana*, wurde genutzt um die Phosphorylierung eines rekombinant erzeugten und aufgereinigten Proteins (hier GUN4) herbeizuführen. Dabei wurde sowohl ein sogenannter *crude extract*, der im Wesentlichen einem Thylakoidextrakt entsprach, als auch isolierte Chloroplasten und deren Sub-Fraktionen erfolgreich zur Phosphorylierung rekombinanter Substrate eingesetzt (sogenannter „full“ Kinaseassay; Abbildung 3.1). Weiterhin wurde der Kinaseassay dahingehend angepasst, dass geringe Mengen von frischem oder aber auch gefrorenem Pflanzenmaterial (30-100 mg Frischgewicht) zur Extrakterstellung eingesetzt werden konnten. Dieser sogenannte „one leaf“ Kinaseassay ermöglichte es, mehrere Genotypen oder den Einfluss von Anzuchtbedingungen in zeitlich enger Abfolge parallel auf die Phosphorylierungskapazität von GUN4 zu untersuchen. Das Substratprotein wurde mit einer definierten Menge Pflanzenextrakt für experimentspezifische Zeitpunkte und Inkubationsbedingungen (zum Beispiel Licht- oder Dunkelexposition) in An- oder Abwesenheit von Zusätzen (zum Beispiel DTT) inkubiert. Der Nachweis der Phosphorylierung des angebotenen Substratproteins nach Auftrennung in einem SDS-PA Gel erfolgte dabei auf zwei Wege. Einerseits wurden Kinaseassays in Anwesenheit von radioaktiv markiertem ATP durchgeführt. Der Nachweis des phosphorylierten Substrates erfolgte mittels Detektion der radioaktiven Strahlung der übertragenen Phosphatgruppe (Autoradiogramm). Andererseits kam für GUN4 eine zweite Detektionsmethode in Betracht. Im Verlauf dieser Arbeit wurde ein Antikörper eingesetzt, der ein C-terminales GUN4-Peptid mit phosphoryliertem Serin erkennt (Abbildung 3.1). Die Vorteile der letztgenannten Detektionsmethode liegen auf der Hand: eine kostengünstigere und apparativ weniger aufwendige sowie schnellere Analyse der Phosphorylierung eines rekombinanten Proteins.

Wenngleich die direkte Analyse der Phosphorylierung eines Proteins durch eine aufgereinigte spezifische Kinase als „Goldstandard“ angesehen werden kann, so hat der entwickelte Kinaseassay mit Pflanzenextrakten für bestimmte Fragestellungen Vorteile. Die Möglichkeit der Analyse der Kinaseaktivität aus einem physiologisch relevanten Kontext heraus, wie die Verwendung von Extrakten verschiedener Genotypen oder von Pflanzen aus variierenden Anzuchsbedingungen, ist als Vorteil gegenüber Assays mit rekombinanter Kinase und Substrat zu werten. Ferner wurde

beobachtet, dass die direkte Inkubation einer rekombinanten Kinase mit einem möglichen Substratprotein zu falsch positiven Ergebnissen führen kann (siehe Abschnitt 3.10.7.3, S.211).



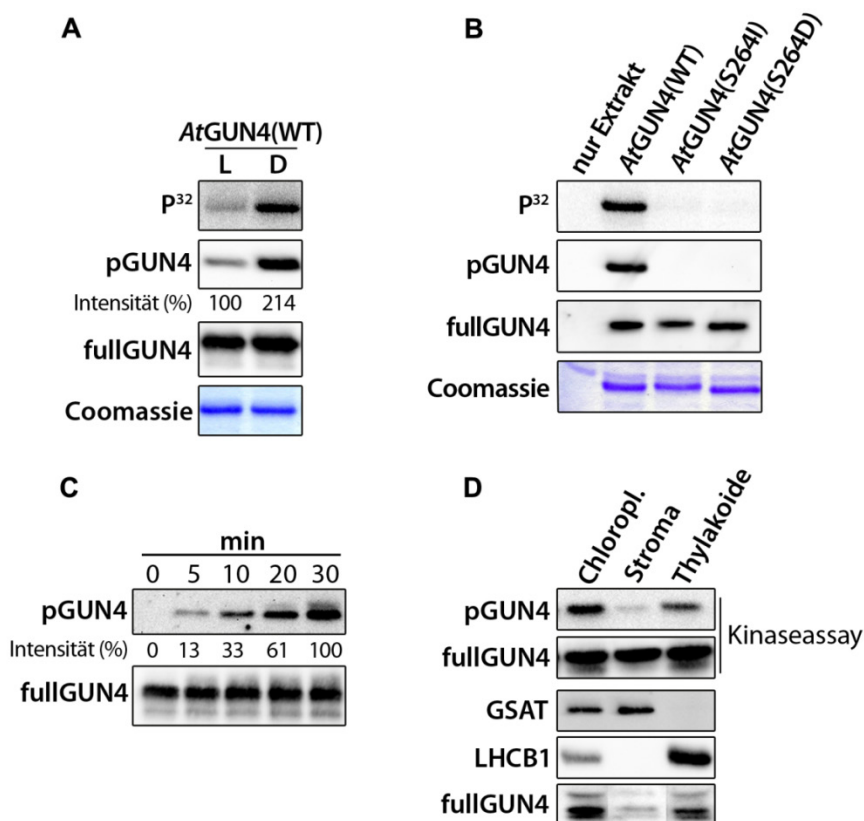
**Abbildung 3.1: Schema zur Durchführung von Kinaseassays mit Pflanzenextrakten und rekombinanten Substraten (z.B. GUN4).**

Weitere Erläuterungen im Text.

Im Verlauf dieser Arbeit zeigte sich, dass die mit den hier verwendeten Protokollen isolierte(n) Kinaseaktivität(en) nicht nur GUN4 phosphorylierten. So konnte die Phosphorylierung weiterer Proteine der Tetrapyrrolbiosynthese (TBS), wie zum Beispiel die MgP Methyltransferase (CHLM) oder die Protochlorophyllid Oxidoreduktasen A und B (PORA und B) untersucht werden (Daten nicht gezeigt; Zusammenarbeit mit M. Rothbart, AG Prof. Grimm, HU Berlin). Ferner wurde eine initiale Charakterisierung der Phosphorylierung von Enzymen des Riboflavin-Stoffwechselweges (Daten nicht gezeigt; RIBA1, RIBA2, RIBA3; Zusammenarbeit mit H. Hiltunen, AG Prof. Grimm, HU Berlin) und chloroplastidärer RNA-Bindeproteine (Daten nicht gezeigt; cpRNPs CP29A und CP31A; Zusammenarbeit mit Ayako Okuzaki, AG Prof. Schmitz-Linneweber, HU Berlin) durch diesen Assay ermöglicht.

### 3.1.2 GUN4 wird durch eine membranständige Kinase an Serin(264) phosphoryliert.

Zu Beginn der Arbeiten zur GUN4-Phosphorylierung galt es, die zuvor per Massenspektrometrie identifizierte Phosphorylierungsstelle des GUN4 (Reiland et al., 2009) zu überprüfen. Zeitgleich wurde eine erste Charakterisierung der Faktoren, die die GUN4-Phosphorylierung beeinflussen könnten, vorgenommen und die Anwendbarkeit eines phosphorylierungsspezifischen GUN4 Antikörper (pGUN4) untersucht.



**Abbildung 3.2: In vitro Phosphorylierung von rekombinanten GUN4-Proteinen mit Extrakten von *Arabidopsis* (At) Pflanzen.**

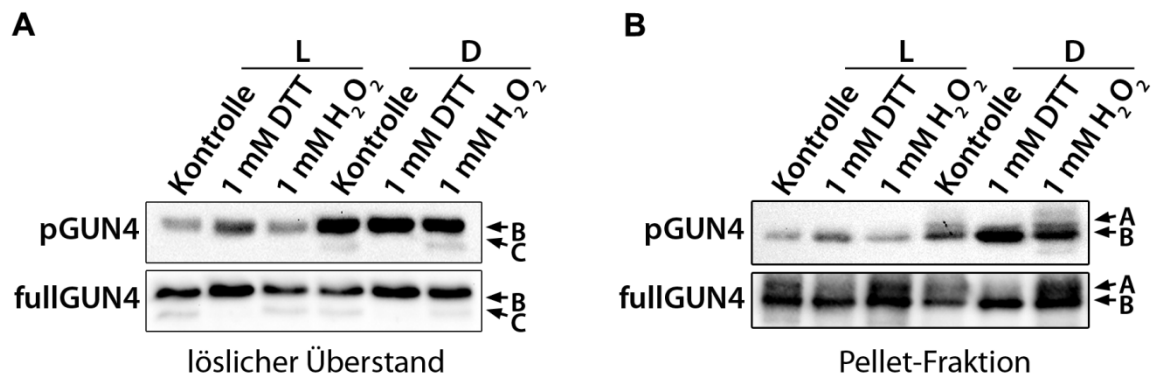
(A) GUN4-Kinaseassay mit rekombinantem AtGUN4(WT) und Thylakoidextrakten inkubiert im Licht (L) oder Dunkelheit (D). Der Kinaseassay wurde in Anwesenheit von radioaktiv markiertem ATP durchgeführt. Die Phosphorylierung wurde mittels Phosphoimagerscreen ( $P^{32}$ , Autoradiogramm) und dem phosphorylierungsspezifischen pGUN4 Antikörper nachgewiesen. Als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung diente ein Western-Blot mit dem fullGUN4 Antikörper und ein Coomassie gefärbtes Proteingel. Analysiert wurde der lösliche Überstand des Kinaseassay. Die relative Signalstärke des pGUN4 Antikörpers ist angegeben. (B) Vergleich der Phosphorylierung von AtGUN4(WT) und den Punktmutanten AtGUN4(S264I) und AtGUN4(S264D). Auch hier erfolgte der Nachweis der Phosphorylierung mittels Phosphoimagerscreen ( $P^{32}$ ) und dem pGUN4 Antikörper. Analysiert wurde der lösliche Überstand des Kinaseassay. (C) Kinetik der AtGUN4(WT)-Phosphorylierung. Die Reaktionsansätze wurden für die angegebenen Zeiträume in der Dunkelheit inkubiert und Aliquots des gesamten Ansatzes per Western-Blot (pGUN4 und fullGUN4 Antikörper) analysiert. (D) GUN4-Kinaseassay mit Fraktionen von isolierten At Chloroplasten (Chloropl.). Die gleichen Mengen an Protein wurden auf GUN4-Kinaseaktivität analysiert. Der Nachweis der Phosphorylierung erfolgte mit dem pGUN4 Antikörper. Die Anwesenheit des rekombinanten AtGUN4(WT) nach dem Kinaseassay wurde mit dem fullGUN4 Antikörper überprüft. Die Reinheit der isolierten Fraktionen wurde mit dem GSAT Antikörper (löslich, im Stroma lokalisiert) und LHCB1 (thylakoidgebunden) überprüft. Diese Abbildung wurde in Richter et al. (2016b) veröffentlicht.

Kinaseassays mit rekombinantem AtGUN4(WT) Protein und Extrakten von im Licht gewachsenen *Arabidopsis* (At) Col-0 Pflanzen zeigten, dass GUN4 im Vergleich zur Lichtinkubation verstärkt in der Dunkelheit phosphoryliert wurde (Abbildung 3.2 A). Dies ließ sich sowohl mit radioaktivem ATP, als auch mit dem pGUN4-Antikörper zeigen (Abbildung 3.2 A). Sowohl im radioaktiven, als auch nicht-radioaktiven Kinaseassay führte der Austausch der putativen Phosphorylierungsstelle (Serin an Position 264) durch Isoleucin (S264I) oder Aspartat (S264D) zum Ausbleiben der GUN4-Phosphorylierung (Abbildung 3.2 B). Unter der Annahme, dass der Aminosäureaustausch an Position 264 die Phosphorylierung einer anderen Aminosäure nicht beeinflusst, wurde somit bewiesen, dass

GUN4 nur eine Phosphorylierungsstelle besitzt (S264). Mit dem hier durchgeführten Assay wurde eine lineare Zunahme ( $R^2=0,994$ ) der GUN4-Phosphorylierung beobachtet (Abbildung 3.2 C). Ferner wurde der Großteil der GUK-Aktivität an der Membranfraktion isolierter At Chloroplasten detektiert (Abbildung 3.2 D). Dies stand im Einklang mit einer präferenziellen Bindung von endogenem GUN4 an die Thylakoidmembran (Abbildung 3.2 D).

### **3.1.3 Untersuchung der Redox-Abhängigkeit der GUN Phosphorylierung**

Die beobachteten Unterschiede zwischen im Licht und in Dunkelheit durchgeführten Kinaseassays ließen den Schluss zu, dass es einen Faktor geben musste, der die GUK im Licht hemmt und in der Dunkelheit aktiviert. Alternativ bestand die Möglichkeit, dass die GUK im Licht nicht aktiviert und in der Dunkelheit nicht gehemmt wurde. Einer der offensichtlichsten Parameter, welcher sich zwischen Licht- und Dunkelinkubation eines Plastidenextraktes verändert, ist das Redox-Potential. Während die lichtgetriebene Photosynthese zu einem allgemein als reduziert angenommenen Redox-Millieu führt, wandelt sich dieses zum oxidierten Zustand in der Dunkelheit (Buchanan und Balmer, 2005; Rochaix et al., 2012; Dietz und Hell, 2015). Es wurde gezeigt, dass die Reduktion des Plastoquinon-Pools sowie von mit der Photosynthese assoziierten Redox-Regulatoren (wie zum Beispiel Thioredoxine) einen Einfluss auf lichtgesteuerte metabolische Reaktionen im Chloroplasten ausüben (Bellafore et al., 2005; Bonardi et al., 2005; Buchanan et al., 2012; Dietz und Hell, 2015). Da es konkrete Belege für diese Art der Regulation enzymatischer Aktivitäten auch für die TBS gibt (Buchanan und Balmer, 2005; Ikegami et al., 2007; Luo et al., 2012; Richter und Grimm, 2013; Richter et al., 2013; Richter et al., 2016c), wurde spekuliert, dass ein ähnlicher Mechanismus auch für die Regulation der GUK vorlag. Daher wurde die Phosphorylierung von GUN4 in Anwesenheit von Chemikalien, die einen Einfluss auf den Redox-Zustand nahmen, untersucht (Abbildung 3.3).



**Abbildung 3.3:** Einfluss reduzierender und oxidierender Chemikalien auf die *in vitro* Phosphorylierung und subplastidäre Lokalisation von rekombinantem GUN4-Protein nach einem Kinaseassay mit Extrakten von *Arabidopsis* (At) Blättern.

Es wurde ein Kinaseassay in Anwesenheit von 1 mM DTT und 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Licht (L) und Dunkelheit (D) durchgeführt und die Reaktionsansätze anschließend durch Zentrifugation in den löslichen Überstand (A) oder die Pelletfraktion (B, hauptsächlich Thylakoide) aufgetrennt. Die Phosphorylierung wurde mit dem phosphorylierungsspezifischen pGUN4 nachgewiesen. Die Anwesenheit der unterschiedlichen immunreaktiven GUN4 Banden (rechte Seite neben Blot: A, B, C) wurde mit dem fullGUN4 Antikörper untersucht. Diese Abbildung wurde in Richter et al. (2016b) veröffentlicht.

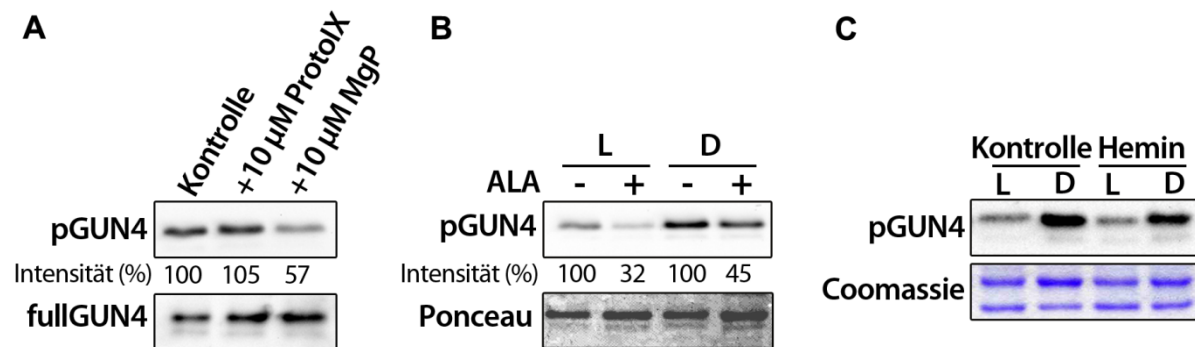
Es zeigte sich, dass das oxidierende Agens Wasserstoffperoxid im Vergleich zur Kontrollreaktion weder in der Dunkelheit noch im Licht einen Einfluss auf die GUN4-Phosphorylierung hatte (Abbildung 3.3 A). Unter Zugabe von DTT schien GUN4 verstärkt phosphoryliert zu werden (Abbildung 3.3 A). Interessanterweise wurde jedoch eine Veränderung des GUN4 Bandenmusters im SDS-Gel nach einem Assay unter reduzierenden Bedingungen beobachtet (Abbildung 3.3 A und B). Während die Kontrollreaktionen und Kinaseassays in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid zu einer Aufspaltung des rekombinanten GUN4 in zwei immunreaktive Spezies führten (Abbildung 3.3 A, Bande B und C), zeigte sich nach DTT-Behandlung lediglich eine immunreaktive GUN4 Bande (Abbildung 3.3 A, +DTT Bande B). Dabei war das Auftreten der im SDS-Gel schneller laufenden Bande C lichtunabhängig. Die separate Analyse der Membranfraktion, gewonnen durch Zentrifugation des Ansatzes nach der Inkubation, deutete auf eine weitere immunreaktive GUN4-Spezies hin (Abbildung 3.3 B). In der Membranfraktion wurde neben der Bande B eine weitere im SDS-Gel langsamer laufende Bande A für GUN4 detektiert. Auch hier verhinderte die Anwesenheit von DTT während des vorangegangenen Kinaseassays die Aufspaltung, wodurch der Eindruck einer stärkeren GUN4-Phosphorylierung unter reduzierten Bedingungen entstand (Abbildung 3.3 B). Alle drei GUN4-Varianten (Bande A, B, C) konnten sowohl im löslichen Überstand beziehungsweise in der Membranfraktion mit dem pGUN4 Antikörper nachgewiesen werden und waren somit phosphoryliert und nicht am C-Terminus verkürzt (Abbildung 3.3).

Auch ließ sich kein Zusammenhang zwischen dem Phosphorylierungszustand des rekombinanten GUN4 und der Bindungsfähigkeit an die Membran feststellen (Abbildung 3.3 A und B). Sowohl das GUN4 mit starker Phosphorylierung (Dunkelinkubation), als auch das GUN4 mit geringem

Phosphorylierungsgrad (Lichtinkubation) wurde in gleichem Maße in der Membranfraktion eines Kinaseassays detektiert (Abbildung 3.3 B). Auf die unterschiedliche Verteilung und die Natur der drei immunreaktiven Versionen des GUN4 und deren möglicher physiologischer Funktion, wird in Abschnitt 3.11 (S. 221) näher eingegangen.

### 3.1.4 Analyse der GUN4-Phosphorylierung in Anwesenheit von Intermediaten der TBS

Eine der interessantesten Eigenschaften von GUN4 ist die Bindung von Protoporphyrin IX (Proto) und Mg Protoporphyrin IX (MgP). Wenngleich die experimentellen Belege für die Notwendigkeit der Porphyrinbindung an GUN4 als Voraussetzung der Stimulation der MgCh widersprüchlich sind, wurde der Einfluss von TBS-Intermediaten auf die GUN4 Phosphorylierung untersucht. Hierfür wurden Kinaseassays mit Extrakten von *At* WT-Pflanzen und rekombinantem GUN4 in Anwesenheit von Intermediaten der TBS durchgeführt (Abbildung 3.4).



**Abbildung 3.4: Einfluss von TBS Intermediaten auf die *in vitro* Phosphorylierung von rekombinantem GUN4.**

(A) Kinaseassay in Anwesenheit von 10 µM ProtoIX oder MgP durchgeführt im Licht. Als Kontrolle diente ein Reaktionsansatz ohne Zusätze. (B) *one leaf* GUN4-Kinaseassay mit Extrakten von ALA-gefütterten Col-0 WT Pflanzen. Die Pflanzen wurden über Nacht ohne (-) oder mit (+) 1 mM ALA inkubiert (endogene Anreicherung von Porphyrinen), die Extrakte erstellt und der Kinaseassay in Licht (L) und Dunkelheit (D) durchgeführt. (C) Kinaseassay in Anwesenheit von 10 µM Hemin, durchgeführt in Licht (L) und Dunkelheit (D). Die Phosphorylierung wurde mit dem phosphorylierungs-spezifischen pGUN4 nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente ein Western-Blot der Kinaseassayansätze mit dem fullGUN4 Antikörper (A), die Ponceau gefärbte Membran (B) oder ein Coomassie gefärbtes SDS-Gel (C). Die relative Signalstärke des pGUN4 Antikörpers ist angegeben (A und B). Teile dieser Abbildung wurden in Richter et al. (2016b) veröffentlicht.

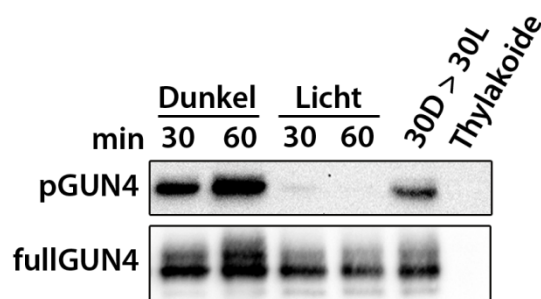
Im Vergleich zur Kontrollreaktion und der Zugabe von Proto führte die Anwesenheit von MgP in einem Kinaseassay zu einer 40%igen Reduktion des GUN4-Phosphorylierungssignals (Abbildung 3.4 A). Eine Abnahme der GUN4-Phosphorylierung wurde ebenfalls beobachtet, wenn Col-0 Pflanzen vor der Herstellung der Extrakte mit ALA gefüttert wurden (Abbildung 3.4 B). Die Inkubation von Pflanzenmaterial mit ALA, eine zentrale Vorstufe für alle Tetrapyrrole, führte zu einer Anreicherung und Erhöhung der *steady state* Gehalte von MgP und anderen Intermediaten (siehe Abschnitt 3.7.1 - Abbildung 3.29, S.166). Somit war anzunehmen, dass auch in diesem Experiment erhöhte Gehalte von Mg-Porphyrinen für die Abnahme der GUN4-Phosphorylierung verantwortlich waren. Die Zugabe



von Hemin, einem löslicheren Häm-Analogen, zu einem Kinaseassay führte hingegen nicht zu einer Veränderung der GUK-Aktivität (Abbildung 3.4 C).

### 3.1.5 Hinweise auf eine lichtabhängige Dephosphorylierung von GUN4

Die Phosphorylierung eines Proteins ist eine reversible post-translationale Modifikation. Die Rückreaktion der Proteinkinasen wird durch Phosphatasen (PPase) katalysiert. Bisher gibt es nur wenige Informationen über plastidäre PPasen und ihre Zielproteine. Dennoch sollte der Versuch unternommen werden, einen Hinweis auf eine mögliche Dephosphorylierung von GUN4 zu erhalten. Angeregt durch den beobachteten Unterschied zwischen Licht- und Dunkelphosphorylierung von GUN4, konnte spekuliert werden, dass im Licht nicht nur eine Repression der GUN4-Phosphorylierung, sondern auch eine Induktion der Dephosphorylierung stattfindet.



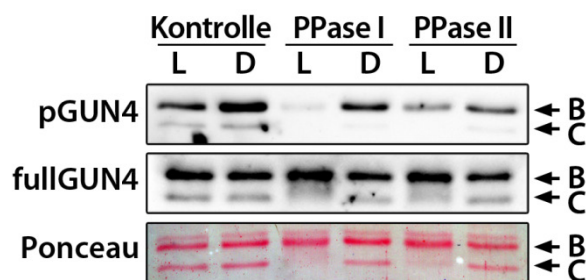
**Abbildung 3.5: Hinweis auf eine lichtabhängige Dephosphorylierung von phosphoryliertem GUN4.**

Es wurde ein Kinaseassay mit rekombinantem AtGUN4(WT) und Col-0 Thylakoidextrakten für die angegebenen Zeiträume in Dunkelheit oder im Licht durchgeführt. Eine dunkelinkubierte Probe (30 min) wurde anschließend für 30 min im Licht inkubiert (30D>30L). Aliquots des gesamten Kinaseassays wurden per Western-Blot (pGUN4 und fullGUN4 Antikörper) analysiert. Als Ladekontrolle diente ein Western-Blot der Kinaseassayansätze mit dem fullGUN4 Antikörper. Als Kontrolle diente ein Kinaseassayansatz ohne rekombinantes GUN4 (Thylakoide), der für 60 min in der Dunkelheit inkubiert wurde. Es wurde eine deutliche Abnahme des Phosphorylierungssignals für GUN4 im Licht beobachtet.

Um diese Fragestellung näher zu analysieren, wurde zunächst ein GUN4 Kinaseassay für unterschiedliche Zeiträume im Licht und Dunkelheit durchgeführt (Abbildung 3.5). Erwartungsgemäß nahm die Phosphorylierung in der Dunkelheit mit zunehmender Inkubationszeit zu. Die parallel im Licht gehaltenen Ansätze zeigten hingegen nur eine geringe Phosphorylierung von GUN4 (Abbildung 3.5). Um nun die Dephosphorylierung sichtbar zu machen, wurde ein für 30 Minuten in der Dunkelheit gehaltener Assayansatz für weitere 30 Minuten dem Licht ausgesetzt (Abbildung 3.5, Probe „30D>30L“). Interessanterweise zeigte sich für die in der Dunkelheit und anschließend im Licht gehaltene Probe (30D>30L) eine deutliche Abnahme des Phosphorylierungssignales für GUN4 im Vergleich zur für 60 Minuten der Dunkelheit ausgesetzten Probe (Abbildung 3.5, Probe „Dunkel 60“). Es wurde daher angenommen, dass das in der Dunkelheit phosphorylierte GUN4 in der anschließenden Lichtphase dephosphoryliert wurde.

### 3.1.6 GUK-Assay in Anwesenheit von Phosphatase-Inhibitoren

Die vorhergehende Analyse ließ den Schluss zu, dass phosphoryliertes GUN4 möglicherweise im Licht dephosphoryliert wurde. Gleichzeitig wurde in den zuvor gezeigten Analysen festgestellt, dass im Vergleich zur Lichtinkubation GUN4 präferenziell im Dunkeln phosphoryliert wird. Um festzustellen, ob das reduzierte Phosphorylierungssignal im Licht eine Folge einer erhöhten PPase-Aktivität war, wurden Kinaseassays in Anwesenheit von zwei unterschiedlichen PPase-Inhibitor-Mixturen durchgeführt (Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.6: Untersuchung der *in vitro* Phosphorylierung von GUN4 in Anwesenheit von Phosphataseinhibitoren (PPase).**

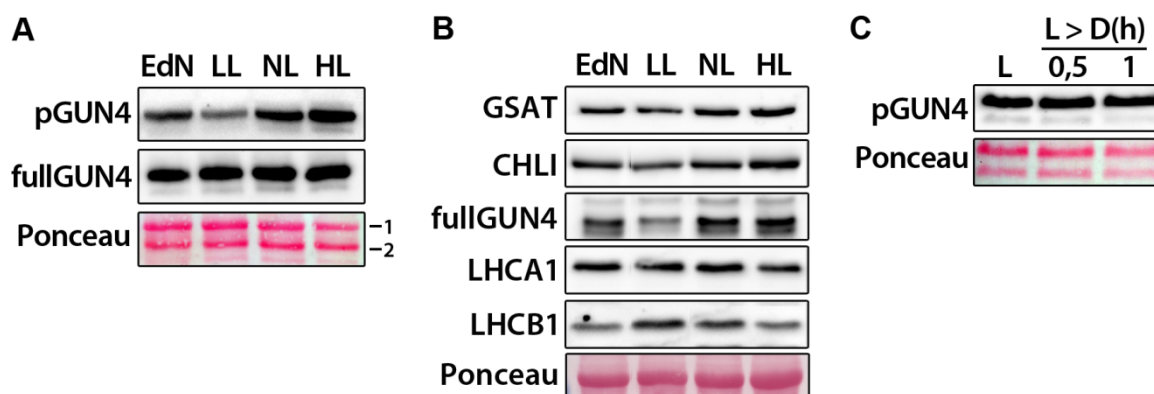
Als Phosphataseinhibitoren wurden eingesetzt: PPase I: „HALT PPase inhibitor mix“ (Thermo Scientific) und PPase II: „PPase inhibitor Cocktail II“ (Sigma). Der Kinaseassay mit Col-0 Thylakoidextrakten und rekombinantem GUN4(WT) wurde im Licht (L) und Dunkelheit (D) durchgeführt. Der lösliche Überstand wurde per Western-Blot (pGUN4 und fullGUN4 Antikörper) analysiert. Die Position der immunreaktiven GUN4 Banden B und C ist angezeigt.

Aus dem in Abbildung 3.6 gezeigten Kinaseassay mit PPase-Inhibitoren ließen sich zwei wesentliche Aussagen ableiten. 1. Anders als ursprünglich angenommen, nahm die Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrollreaktion im Licht nach Zugabe der PPase-Inhibitoren nicht zu, sondern ab. Dies galt auch für die Dunkelinkubationen (Abbildung 3.6). 2. Die verwendeten PPase-Inhibitoren hatten einen Einfluss auf die zuvor beobachtete Aufspaltung des rekombinanten GUN4s (siehe Abschnitt 3.11, S.221). Es zeigte sich, dass im Vergleich zur Kontrollreaktion in den im Licht inkubierten Kinaseassays mit PPase-Inhibitoren das Auftreten der immunreaktiven Bande C ausblieb, beziehungsweise vermindert war (Abbildung 3.6; Signal für „fullGUN4“). In der Dunkelheit hingegen ließen sich die beiden immunreaktiven Banden B und C mit dem fullGUN4 Antikörper im löslichen Überstand des Kinaseassay nachweisen.

### 3.1.7 Untersuchung der GUK-Aktivität unter verschiedenen Lichtbedingungen

Die bisher gezeigten Experimente zur Phosphorylierung des rekombinanten GUN4 wurden größtenteils mit Extrakten von im Licht angezogenen *At* Pflanzen durchgeführt. Um nun eine Aussage über die GUK-Aktivität in Pflanzen aus unterschiedlichen Anzuchtbedingungen treffen zu können, wurden *At* Col-0 Pflanzen in unterschiedlichen Lichtintensitäten angezogen und ein Kinaseassay mit

diesen Extrakten durchgeführt. Zeitgleich wurde die GUK-Aktivität in Extrakten von Pflanzen zum Ende der Nachtphase und nach kurzzeitiger Dunkelinkubation untersucht (Abbildung 3.7).



**Abbildung 3.7: Untersuchung der GUN4-Kinaseaktivität unter verschiedenen Lichtbedingungen.**

*Arabidopsis* Col-0 WT Pflanzen wurden im Schwachlicht (LL, 20  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), Normallicht (NL, 120  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und Hochlicht (HL, 300  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) angezogen. Die Kinaseaktivität gegen rekombinantes AtGUN4(WT) (A) sowie der endogene Gehalt von GUN4 per Western-Blot (B) wurden untersucht. Als zusätzliche Bedingung wurden Col-0 Pflanzen zum Ende der Nacht (EdN) beprobt und analysiert. (A) Aliquots des gesamten Kinaseassays wurden per Western-Blot (pGUN4 und fullGUN4 Antikörper) analysiert. Die Position des rekombinanten GUN4(WT) (2) und der LHC-Proteine (1) der eingesetzten Extrakte ist angegeben. (B) Zusätzlich zu GUN4 wurden weitere Proteine der Tetrapyrrolbiosynthese und die LHCA1/B1-Proteine per Western-Blot analysiert. Die GUN4-Kinaseaktivität korrelierte mit dem endogenen GUN4-Gehalt unter den verschiedenen Anzuchtbedingungen. (C) *one leaf* GUN4-Kinaseassay mit Extrakten von Col-0 Pflanzen, die für kurze Zeiträume der Dunkelheit ausgesetzt waren. Die Pflanzen wurden 2h nach Belichtungsbeginn (L) für 0,5 und 1h in der Dunkelheit inkubiert und anschließend für einen Kinaseassay genutzt (L>D).

GUN4-Kinaseassays mit Extrakten von *At* Pflanzen die im Schwachlicht, Normallicht und Hochlicht angezogen wurden zeigten, dass die GUK-Aktivität mit steigender Lichtintensität zunahm. Während im Schwachlicht (20  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) die geringste GUK-Aktivität detektiert wurde, nahm diese in im Normallicht (120  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und Hochlicht (300  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) angezogenen Pflanzen zu (Abbildung 3.7 A). Ferner war zu beobachten, dass die GUK-Aktivität 2 Stunden nach Belichtungsbeginn deutlich stärker ausfiel, als zum Ende der Nacht (Abbildung 3.7 A; Vergleich „EdN“ mit „NL“). Im direkten Vergleich mit den per Western-Blot detektierten endogenen GUN4-Gehalten in diesen Extrakten (Abbildung 3.7 B), zeigte sich eine deutliche Korrelation zwischen GUK-Aktivität und GUN4-Gehalt. Pflanzen die im Schwachlicht angezogen wurden, wiesen den geringsten GUN4 Gehalt (Abbildung 3.7 B) und die geringste GUK-Aktivität auf (Abbildung 3.7 A). Im Normal- und Hochlicht stiegen der GUN4-Gehalt und die GUK-Aktivität im Vergleich zum Schwachlicht. Die gleiche Korrelation zeigte sich auch für die Pflanzen, die zum Ende der Nacht analysiert wurden (Abbildung 3.7 A und B). Eine kurzzeitige Dunkelinkubation von Pflanzen führte zu keiner Veränderung der GUK-Aktivität (Abbildung 3.7 C).

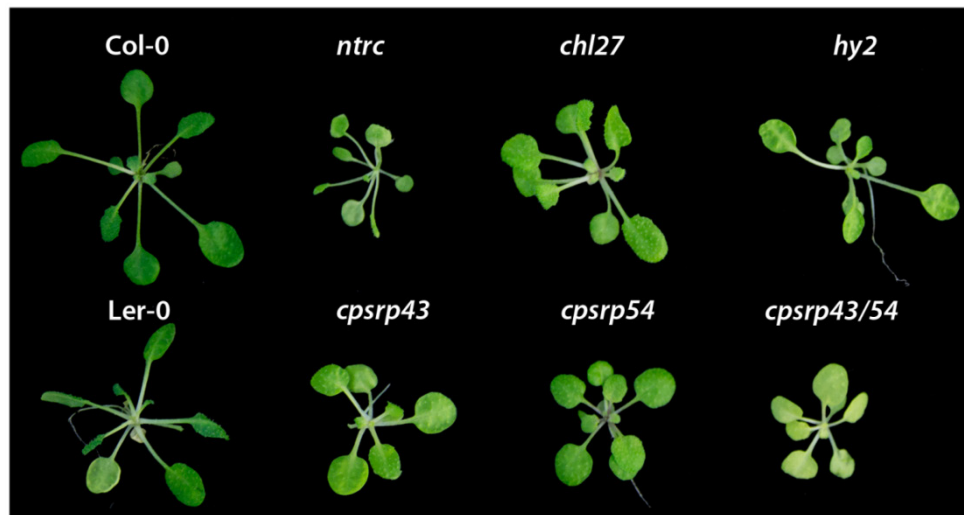
### 3.1.8 GUK-Aktivität in chlorotischen Mutanten

Da eine Veränderung der Porphyringehalte einen Einfluss auf die GUN4-Phosphorylierung hatte (Vergleich Abschnitt 3.1.4, S.124), sollte ein möglicher regulatorischer Zusammenhang zwischen GUK-Aktivität und Aktivität der TBS analysiert werden. Hierfür kamen Mutanten der TBS (*ntrc*, *chl27*, *hy2*), sowie des LHC-Integration *pathway* (*cpsrp43* und *54*) zum Einsatz.

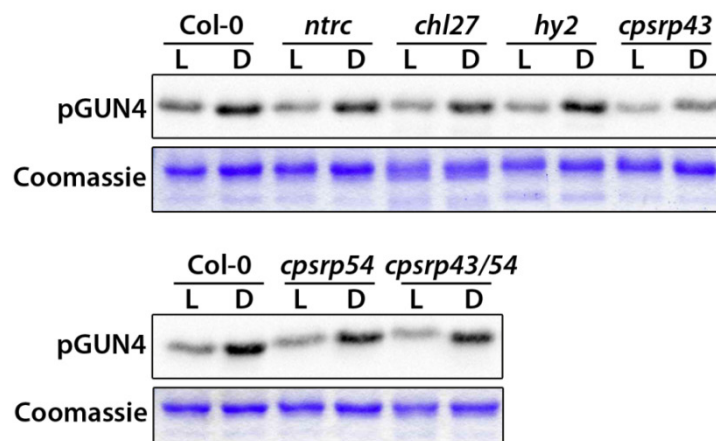
Die *ntrc* Mutante ist eine *knockout* Mutante für die NADPH-ABHÄNGIGE THIOREDOXIN REDUCTASE C, welche einen Einfluss auf die Redox-Regulation von TBS Enzymen hat (Stenbaek et al., 2008; Stenbaek und Jensen, 2010; Richter et al., 2013). Als eine Folge des *knockdowns* der katalytischen Untereinheit der OXIDATIVEN MgPMME CYCLASE (CHL27) akkumuliert die *chl27* Mutante das Substrat dieses Enzymschrittes (MgPMME) (Tottey et al. (2003), A. Richter, B. Grimm, nicht veröffentlicht). Die *hy2* Mutante ist im Gen für die *PHYTOCHROMOBILIN SYNTHASE* mutiert und zeichnet sich durch reduzierte Mengen von Phytochromobilin aus. Phytochromobilin ist als Chromophor des Phytochroms an der lichtabhängigen Induktion der Expression von TBS-Genen beteiligt (Kohchi et al., 2001). Die Doppelmutanten für das *CHLOROPLAST SIGNAL RECOGNITION PARTICLE 43* und *54* (*cpsrp43/54*) zeigen einen Defekt in der Integration von LHCs in die Thylakoidmembran. Die reduzierte Integration von LHCs in die Thylakoidmembran hat einen negativen Einfluss auf die Enzyme der TBS (P. Wang, A. Richter, B. Grimm, nicht veröffentlicht). Im Gegensatz zu den anderen Mutanten weist die *chl27* keine reduzierte ALA-Syntheskapazität auf. Wenngleich die Ursachen unterschiedlich sind, so zeichnen sich alle analysierten Mutanten durch einen reduzierten Chlorophyll-Gehalt (Chl) und chlorotischen Phänotyp aus (Abbildung 3.8 A).

Im Vergleich zur WT-Kontrolle wiesen alle analysierten Mutantenextrakte dasselbe Potential zur GUN4-Phosphorylierung auf. Ein Unterschied in der Fähigkeit, GUN4 im Licht oder der Dunkelheit zu phosphorylieren, konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 3.8 B).

A



B



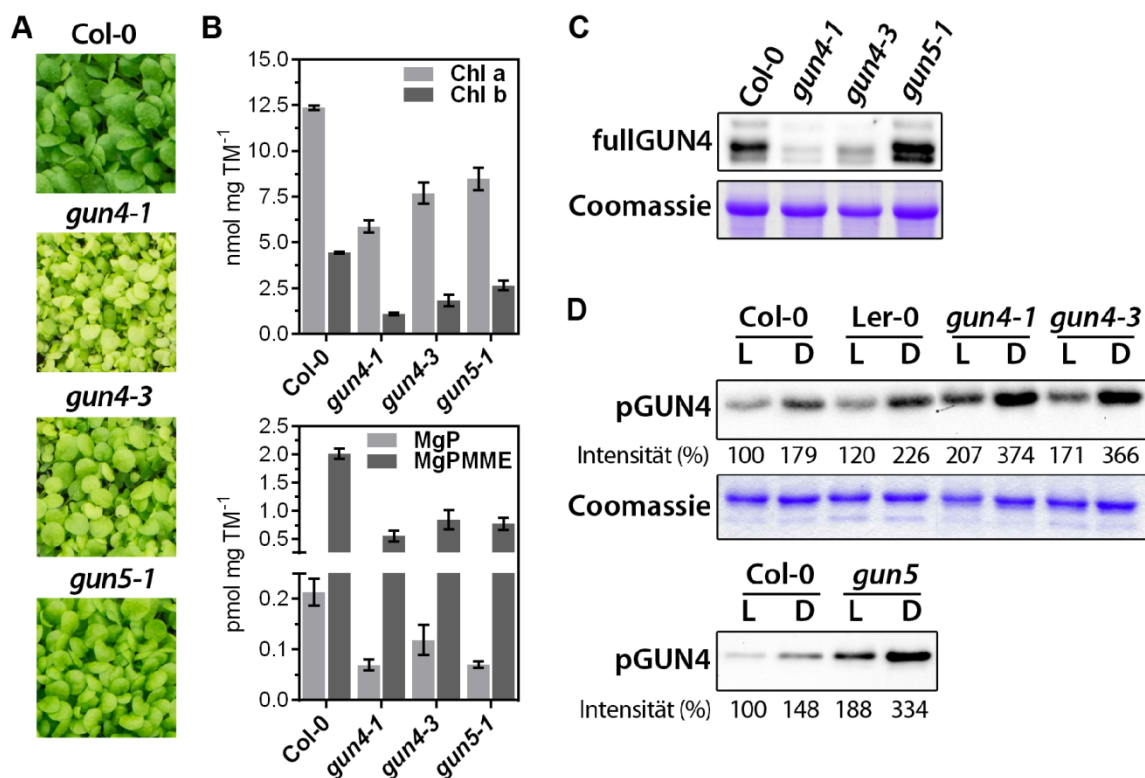
**Abbildung 3.8: GUN4-Kinaseassay mit Extrakten von chlorotischen Mutanten der Tetrapyrrolbiosynthese und des LHC-Integration *pathways*.**

(A) Phänotyp der 3-6 Wochen alten Mutantenlinien im Kurztag bei  $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Im Vergleich zu den jeweiligen WT-Kontrollen (Col-0 und Ler-0) zeigten alle Mutanten eine Reduktion des Chlorophyllgehaltes. Untersucht wurden: *ntrc* (NADPH DEPENDENT THIOREDOXIN REDUCTASE C), *chl27* (OXIDATIVE CYCLASE SUBUNIT CHL27), *hy2* (PHYTOCHROMOBILIN SYNTHASE), *cpsrp43/54* (CHLOROPLAST SIGNAL RECOGNITION PARTICLE 43/54). (B) *One leaf* Kinaseassay mit Extrakten der unter (A) gezeigten Mutanten durchgeführt in Licht (L) und Dunkelheit (D). Die lösliche Fraktion des Kinaseassays wurde mit dem pGUN4 Antikörper (Western-Blot) und auf einem Coomassie gefärbten SDS-Gel analysiert. Alle Mutanten zeigten eine WT-artige GUN4-Kinaseaktivität. Diese Abbildung wurde in Richter et al. (2016b) veröffentlicht.

### 3.1.9 GUK-Aktivität in *gun4* und *gun5* Mutanten

Da GUN4 einen stimulierenden Einfluss auf die MgCh hat, wurde vermutet, dass die GUN4-Phosphorylierung in einer regulatorischen Wechselbeziehung zu den Komponenten der MgCh und/oder GUN4 steht. Daher wurden Analysen mit Mutanten von *GUN4* und der katalytischen H Untereinheit der MgCh (*CHLH*) durchgeführt (Abbildung 3.9). Wie bereits bekannt war (Mochizuki et al., 2001; Larkin et al., 2003; Peter und Grimm, 2009), haben Mutationen in *GUN4* und *CHLH* einen negativen Einfluss auf die TBS. Die zwei *GUN4* Mutanten, *gun4-1* (Punktmutation) und *gun4-3* (T-DNA Insertion), sowie die *gun5-1* Mutante (Punktmutation) akkumulierten weniger Chl als die WT-

Pflanzen (Abbildung 3.9 A und B). Die Reduktion des Chl-Gehaltes war eine direkte Konsequenz einer reduzierten ALA-Synthesekapazität und der Beeinträchtigung der MgCh-Aktivität, die sich in reduzierten Mengen des Produktes der MgCh-Reaktion (MgP) widerspiegelte. Die Chl- und *steady state* Gehalte von MgP und MgPMME sanken auf circa 50% des WT-Gehaltes in den *gun4* und *gun5* Mutanten (Abbildung 3.9 B). Während die beiden GUN4-Mutanten eine starke Reduktion des GUN4-Gehaltes aufwiesen, zeigte sich in *gun5-1* eine deutliche Erhöhung des GUN4 im Vergleich zur WT-Kontrolle (Abbildung 3.9 C).



**Abbildung 3.9: Phänotyp, Chlorophyll- (Chl), Porphyringehalte und GUN4-Kinaseaktivität in *gun4-1*, *gun4-3* und *gun5* Mutanten.**

(A) Phänotyp der analysierten Genotypen (2 Wochen, Kurztag, 100  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). (B) Chl- und Porphyringehalte. Daten sind als Mittelwert  $\pm$  S.D. für  $n=4$  gezeigt. (C) Western-Blot-Analyse des GUN4-Gehaltes in den gezeigten Linien. (D) *one leaf* Kinaseassay mit Extrakten von *gun4* und *gun5* Mutanten durchgeführt im Licht (L) und in Dunkelheit (D). Die Phosphorylierung wurde mit dem phosphorylierungsspezifischen pGUN4 Antikörper nachgewiesen. Die relative Signalstärke des pGUN4 Antikörpers ist angegeben (Col-0 Licht= 100%). *gun4* und *gun5* Mutanten zeigten eine erhöhte GUN4-Kinaseaktivität. Diese Abbildung wurde in Richter et al. (2016b) veröffentlicht.

Der mit den Extrakten von *gun4* und *gun5* Mutanten durchgeführte Kinaseassay ergab eine Verbindung zwischen GUK-Aktivität und der Aktivität der MgCh. Im Vergleich zu den Kontrollreaktionen konnte sowohl im Licht, als auch in der Dunkelheit eine Verdoppelung der GUN4-Phosphorylierung durch *gun4* und *gun5* Extrakte beobachtet werden (Abbildung 3.9 D).

### 3.1.10 Zusammenfassung zur *in vitro* Phosphorylierung von GUN4

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass GUN4 verstärkt in der Dunkelheit an einer Aminosäure (S264) phosphoryliert wurde. Bereits nach wenigen Minuten war eine deutliche *in vitro* Phosphorylierung des GUN4 zu beobachten. Der detektierte Unterschied in der Phosphorylierungsstärke zwischen Licht und Dunkelinkubation war keine Folge einer redox-abhängigen Regulation der GUK. Da es einen Hinweis auf eine lichtabhängige Dephosphorylierung gab, konnte über die Existenz einer GUN4 spezifischen Phosphatase spekuliert werden. Reduzierte Chl-Gehalte hatten nicht *per se* eine Auswirkung auf die Phosphorylierung von GUN4. Vielmehr hatten MgP und die durch die MgCh katalysierte Reaktion einen regulatorischen Einfluss auf die GUN4-Phosphorylierung. Ferner korrelierte der Gehalt von endogenem GUN4 mit der GUK-Aktivität unter verschiedenen Anzuchtsbedingungen.

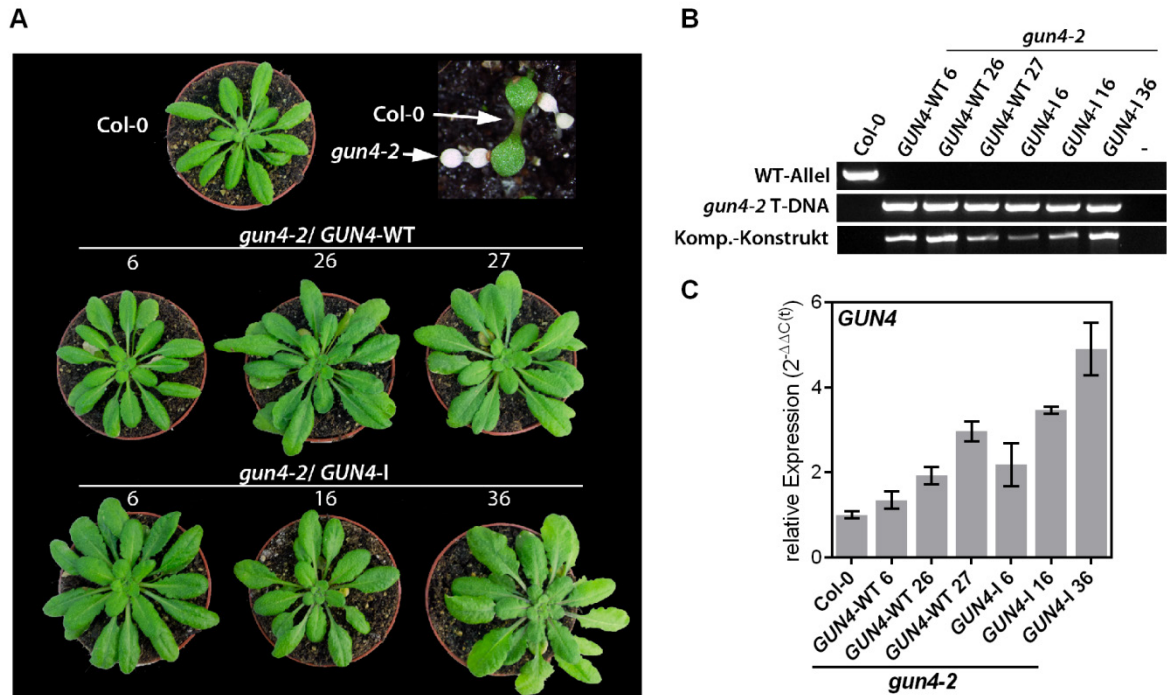




### 3.2 Komplementation einer *gun4 knockout* Mutante mit nicht-phosphorylierbarem GUN4(S264I)

Zunächst wurde vermutet, dass die GUN4-Phosphorylierung einen positiven Einfluss auf dessen Funktion hat. Um daher Aussagen über die *in vivo* Funktion der GUN4-Phosphorylierung treffen zu können, wurden *gun4-2 knockout* Mutanten mit genomischen Konstrukten, die für das WT-Protein (GUN4(WT)) und eine nicht-phosphorylierbare GUN4(S264I) Variante kodierten, komplementiert. In die klonierten Sequenzen (in pCambia3301) wurden das (mutierte) *AtGUN4*-Exon, sowie 800 Basepaare (bp) *upstream* (endogener Promotor) und 600 bp *downstream* der kodierenden Sequenz für GUN4 eingeschlossen. Da die homozygote *gun4-2 knockout* Mutante nur weiße Keimlinge bildete, die nach wenigen Tagen Wachstum auf Erde abstarben (Abbildung 3.10 A), wurde die *gun4-2* Mutante im heterozygoten Zustand transformiert. Nach Selektion mittels geeignetem Marker (Phosphinotricin-Resistenz) wurden in den nachfolgenden Generationen homozygote *gun4-2* Komplementationslinien durch Genotypisierung isoliert (Abbildung 3.10 A).

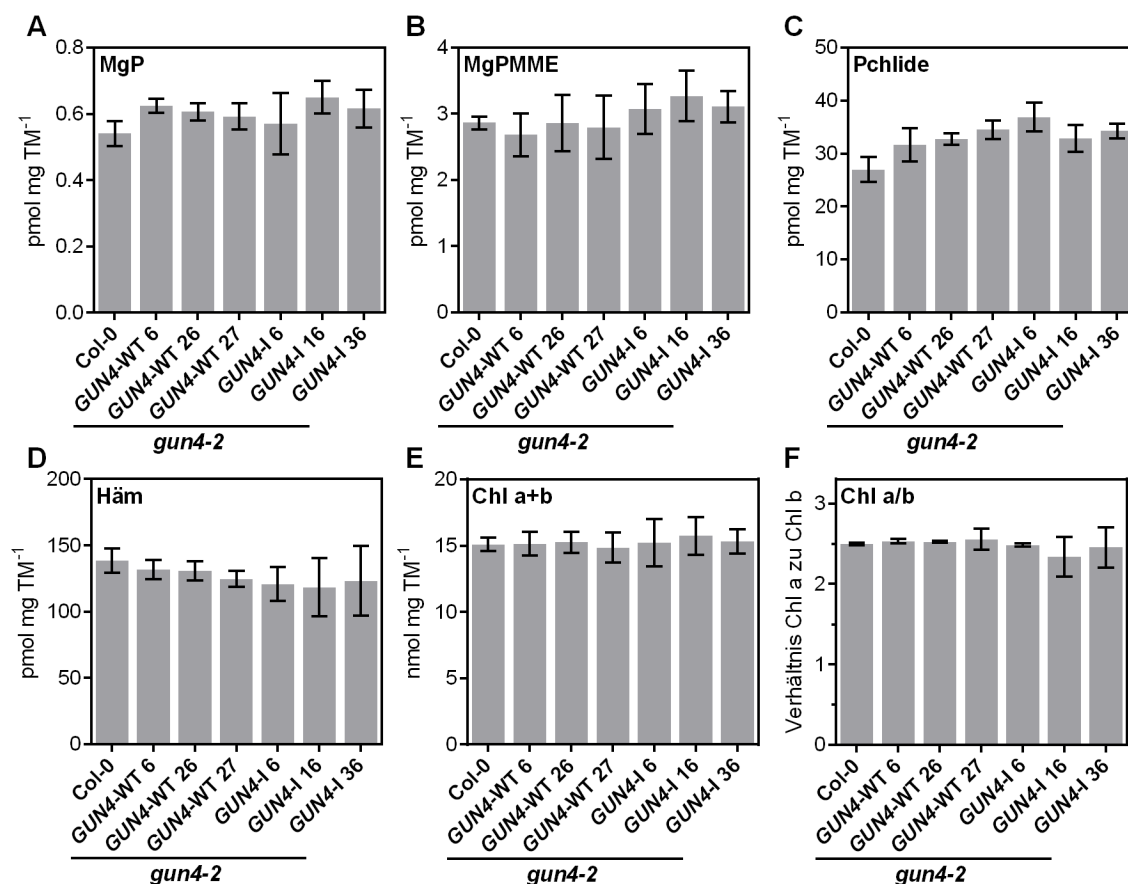
Für alle isolierten Linien (GUN4(WT): *GUN4*-WT und GUN4(S264I): *GUN4*-I) wurde die Abwesenheit eines Amplifikates für das WT-Allel und die Anwesenheit der *gun4-2* T-DNA per PCR bestätigt. Ferner wurde das Komplementationskonstrukt nachgewiesen (Abbildung 3.10 B) und mittels Sequenzierung des Amplifikates auf die Anwesenheit der Mutation überprüft (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.10: Komplementation einer *gun4-2* knockout Mutante mit genomischen Konstrukten, die für GUN4(WT) (*GUN4-WT*) und GUN4(S264I) (*GUN4-I*) kodierten.**

(A) Phänotypen der analysierten Genotypen nach Anzucht für 6 Wochen im Kurztag bei  $120 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Als Kontrolle ist der Col-0 WT gezeigt. Ebenfalls gezeigt ist die homozygote *gun4-2* Mutante 5 Tage nach Keimung im Kurztag bei  $120 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (weiße Pflanzen, oben rechts). (B) Genotypisierung der *GUN4-WT* und *GUN4-I* Linien. Gezeigt sind die PCR-Amplifikate für das WT-Allel, die *gun4-2* T-DNA (Hintergrund der Komplementationslinien), sowie das eingebrachte Komplementationskonstrukt (Komp.-Konstrukt). Als Negativkontrolle (-) wurde Wasser eingesetzt. (C) Expression des *GUN4* in den Komplementationslinien, angezogen für 14 Tage im Kurztag bei  $120 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Die Ernte erfolgte 2h nach Belichtungsbeginn. Die Berechnung der Expression erfolgte relativ zur WT-Kontrolle (Col-0) und den Referenzgenen *SAND* und *PEX4* ( $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ ). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$ SEM für  $n=3$  gezeigt. Diese Abbildung wurde in Richter et al. (2016b) veröffentlicht.

Für jedes Konstrukt wurden Linien isoliert, die eine WT-artige, eine leicht erhöhte Expression, sowie eine deutlich stärkere Expression des Transgenes im Vergleich zur WT-Kontrolle (Col-0) aufwiesen (Abbildung 3.10 C). Unabhängig von der Stärke der Expression zeigten alle Linien einen WT-artigen Phänotyp ohne auffällige Wachstumsverzögerungen oder andere makroskopischen Veränderungen. Im Vergleich zu den homozygoten *gun4-2* Mutanten führte die Expression von *GUN4-WT* und *GUN4-I* zur vollständigen Komplementation des weißen Phänotyps (Abbildung 3.10 A). Da die homozygoten *gun4-2* Mutanten nach wenigen Tagen Anzucht auf Erde abstarben, wurden diese unter den hier gewählten Bedingungen nicht eingehender analysiert.

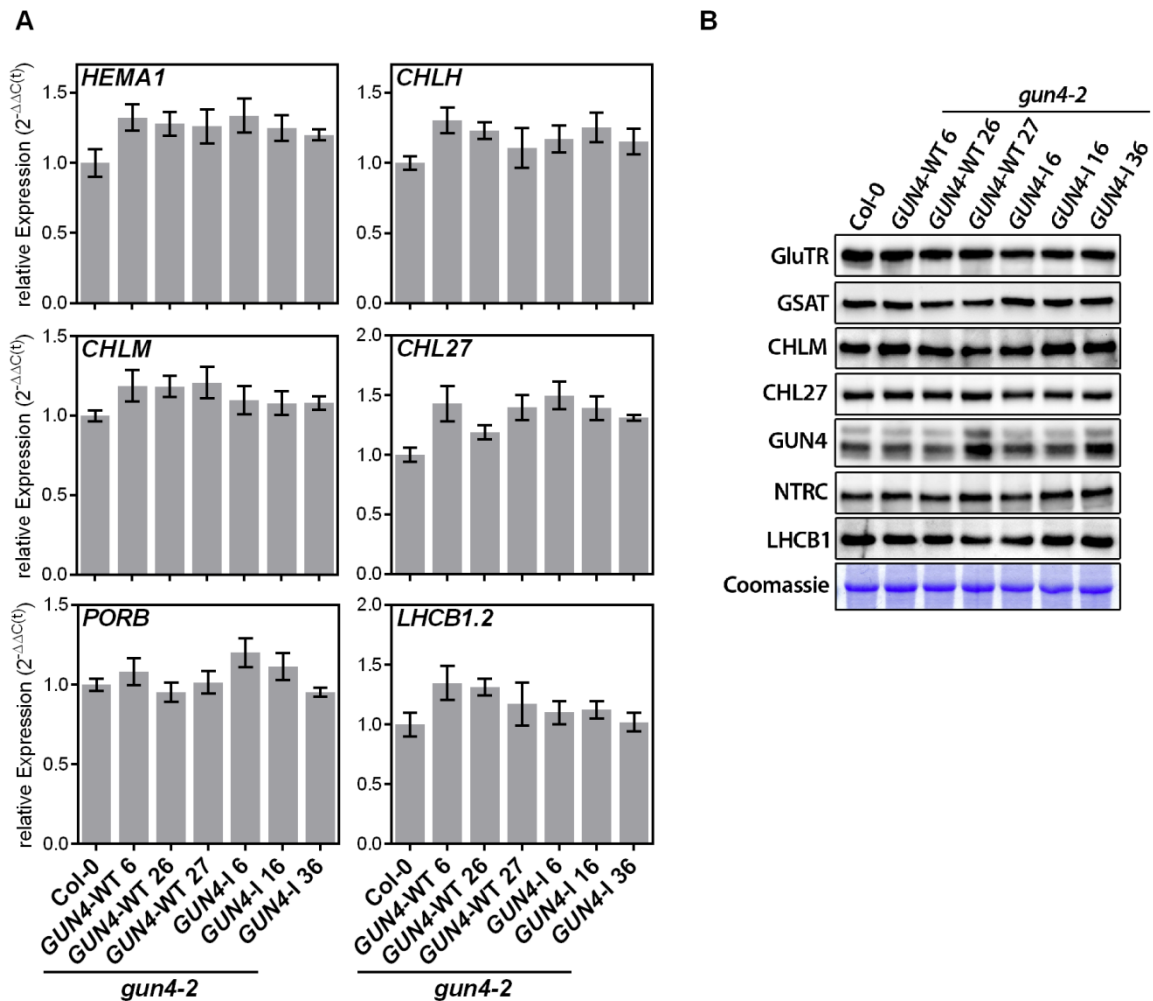


**Abbildung 3.11: Analyse der Intermediate und Endprodukte der TBS in *gun4-2* Komplementationslinien (GUN4(WT):GUN4-WT, GUN4(S264I):GUN4-I).**

Die Pflanzen wurden für 14 Tage im Kurztag bei 120  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  angezogen. Die Ernte erfolgte 2h nach Belichtungsbeginn. Die Proben für Pchlido wurden zum Ende der Nacht geerntet (A) MgP, (B) MgPMME, (C) Pchlido, (D) Häm, (E) Gehalt von Chlorophyll (Chl) a und b, (F) Chl a zu b-Verhältnis. TM= Trockenmasse. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  S.D. für n=4 gezeigt.

In den *gun4-2*/GUN4-I Linien wurden im Vergleich zum WT und den GUN4-WT Linien keine Unterschiede in den *steady state* Gehalten von MgP, MgPMME und Pchlido gemessen (Abbildung 3.11 A-C). Auch die Endprodukte der TBS Häm und Chl sowie das Chl a/b-Verhältnis, waren in den *gun4-2*/GUN4-I Linien auf WT-artigem Niveau (Abbildung 3.11 D-F).

Wenngleich die Akkumulation von Intermediaten und Endprodukten der TBS durch die Anwesenheit von nicht-phosphorylierbarem GUN4 nicht negativ beeinflusst wurde, sollte analysiert werden, ob sich das Ausbleiben der GUN4-Phosphorylierung auf die Expression der an der TBS beteiligten Gene beziehungsweise auf die Gehalte der korrespondierenden Genprodukte auswirkte.



**Abbildung 3.12: Analyse der (A) Genexpression und (B) des Proteingehaltes von an der TBS beteiligten und assoziierten Proteinen in *gun4-2* Komplementationslinien (GUN4(WT):GUN4-WT und GUN4(S264I):GUN4-I).**

Die Pflanzen wurden für 14 Tage im Kurztag bei  $120 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  angezogen. Die Ernte erfolgte 2h nach Belichtungsbeginn. (A) Die Berechnung der Expression erfolgte relativ zur WT-Kontrolle (Col-0) und dem Referenzgen *PEX4* ( $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ ). Daten sind als Mittelwert  $\pm$ SEM für  $n=3$  gezeigt. Teile dieser Abbildung wurden in Richter et al. (2016b) veröffentlicht.

Wie Abbildung 3.12 zu entnehmen ist, wurde für die analysierten Gene keine Veränderung in der Expression zwischen Col-0, *gun4-2*/GUN4-WT und *gun4-2*/GUN4-I Linien festgestellt. Sowohl die Expression von *HEMA1*, das für das ratenlimitierende Enzym der TBS, die Glutamyl-tRNA Reduktase kodiert, als auch für *CHLH* (die MgCh H Untereinheit) waren unverändert. Auch die Expressionslevel der MgP Methyltransferase (*CHLM*), die katalytische Untereinheit der oxidativen Cyclase (*CHL27*) oder die Protochlorophyllid Oxidoreductase B (*PORB*) waren in den *gun4-2*/GUN4-I Linien nicht vom WT und zu unterscheiden. Auch die mRNA für ein Lichtsammelkomplex-Protein (*LHCB1.2*) lag in den *gun4-2*/GUN4-I Linien in WT-artigen Mengen vor (Abbildung 3.12 A). Obwohl nicht immer eine Korrelation zwischen Genexpression und Akkumulation des Genproduktes besteht, ließ sich auf Proteinebene ein ähnliches Verhalten feststellen. Mit Ausnahme von GUN4, das aufgrund der variierenden Expression von GUN4 in den Komplementationslinien (Vergleich Abbildung 3.10 C) in

unterschiedlichen Mengen detektiert wurde, zeigten die *gun4-2/GUN4*-WT oder *gun4-2/GUN4-I* Linien WT-artige Gehalte der analysierten Proteine (Abbildung 3.12 B).

Abschließend kann festgehalten werden, dass die Expression eines nicht-phosphorylierbarem GUN4-Proteins im homozygoten *gun4-2 knockout* Hintergrund unter Standardwachstumsbedingungen zur vollständigen Komplementation des weißen Phänotyps führte. Anders als zunächst angenommen, führte der *knockout* der Phosphorylierungsstelle im GUN4(S264I) Protein nicht zu einer Veränderung der Funktion von GUN4 *in planta*.

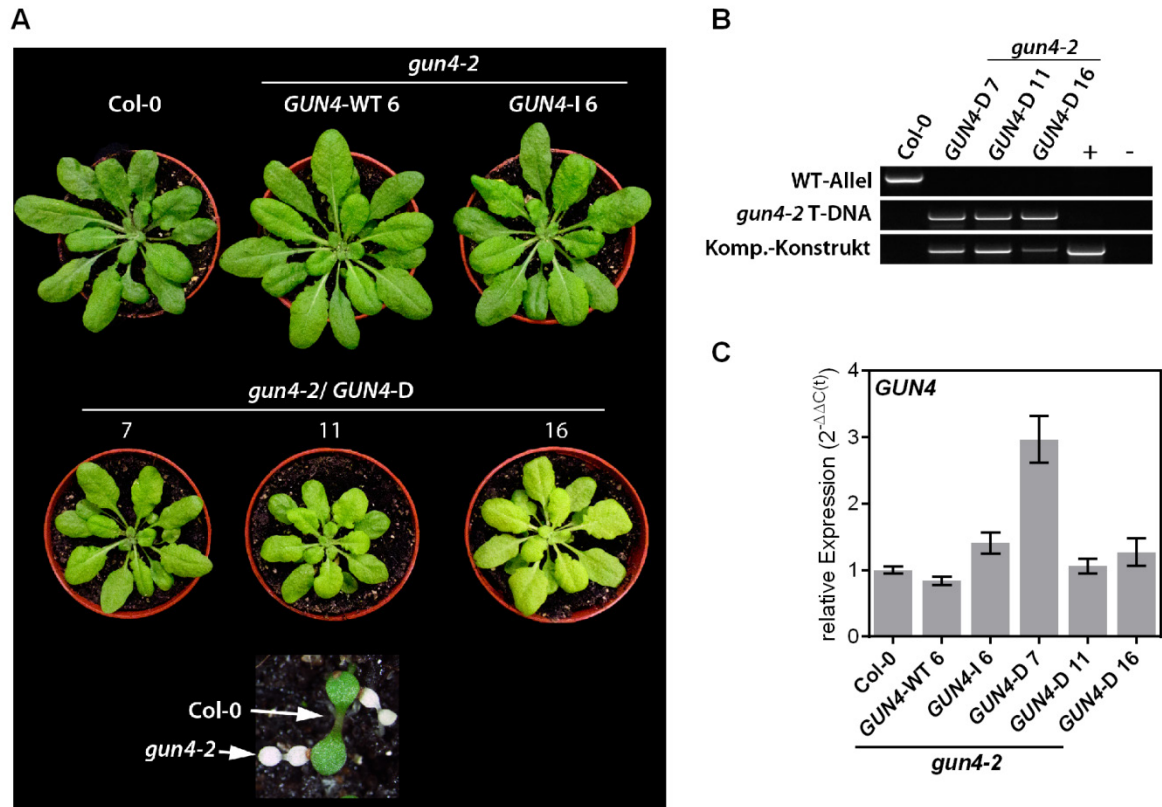


### 3.3 Expression von GUN4(S264D) in der *gun4-2 knockout* Mutante (konstitutives Phosphomimikry)

Wie sich herausstellte, nimmt die Phosphorylierung keinen positiven Einfluss auf die Funktion von GUN4. Daher wurde die Arbeitshypothese dahingehend angepasst, dass die Phosphorylierung des GUN4 einen negativen Effekt auf die Funktion des GUN4 *in planta* haben könnte.

Um auch diese Hypothese unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen, musste ein Weg gefunden werden, der es erlaubte, eine konstitutive GUN4-Phosphorylierung *in planta* herbeizuführen oder zu simulieren. In der Hoffnung, dass ein erhöhter Kinasegehalt zu mehr phosphoryliertem Substrat führen würde, könnte einerseits die spezifische Kinase für GUN4 überexprimiert werden. Eine Alternative besteht im sogenannten „Phosphomimikry“ eines Proteins. Dabei wird die phosphorylierte Aminosäure, hier Serin, gegen eine Aminosäure ausgetauscht, welche dem Phosphoserin in Struktur, Größe und vor allem in der Ladung unter physiologischen Bedingungen ähnlich ist. Der Transfer einer Phosphatgruppe auf Serin führt eine negative Ladung ein, die durch die Phosphomimikry-Aminosäure dauerhaft simuliert werden kann. Dies ist auch ein wesentlicher Vorteil gegenüber der Überexpression der Kinase. Durch die Expression einer Phosphomimikry-Variante eines Proteins in einem *knockout* Hintergrund wird sichergestellt, dass *alle* gebildeten Proteine die Phosphorylierung vortäuschen. Um den funktionellen Einfluss einer Phosphorylierung auf ein Protein zu analysieren, wurde dieser Ansatz bereits mehrfach und in anderen Bereichen der Biologie angewandt (Maciejewski et al., 1995; Léger et al., 1997; Oreb et al., 2007; Willig et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit fiel die Wahl auf den Austausch von Serin (S) zu Aspartat (D). Wie schon für die nicht-phosphorylierbare GUN4-Version beschrieben, wurde auch hier ein genomisches Konstrukt (in pCambia3301) mit (mutiertem) *GUN4*-Exon, sowie 800 Basepaare (bp) *upstream* (endogener Promotor) und 600 bp *downstream* der kodierenden Sequenz für GUN4 erstellt, in den *gun4-2* Hintergrund transformiert und homozygote Komplementationslinien isoliert (Abbildung 3.13).

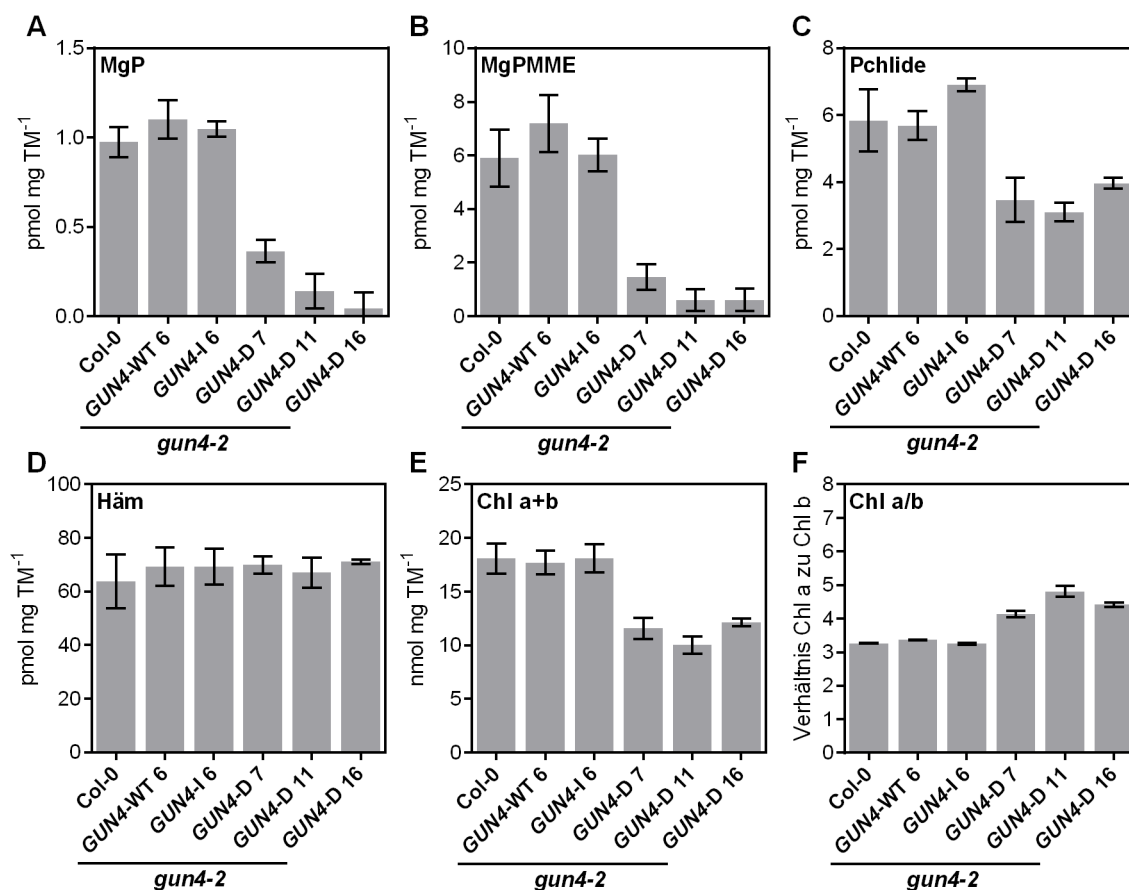


**Abbildung 3.13: Komplementation einer *gun4-2* knockout Mutante mit genomischen Konstrukten, die für *GUN4*(WT) (*GUN4-WT*), *GUN4*(S264I) (*GUN4-I*) und *GUN4*(S264D) (*GUN4-D*) kodierten.**

(A) Phänotypen der analysierten Genotypen nach Anzucht für 6 Wochen im Kurztag bei  $120 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Als Kontrolle ist der Col-0 WT gezeigt. Ebenfalls gezeigt ist die homozygote *gun4-2* Mutante 5 Tage nach Keimung im Kurztag bei  $120 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (weiße Pflanzen, unten). (B) Genotypisierung der *GUN4-D* Linien. Gezeigt sind die PCR-Amplifikate für das WT-Allel, die *gun4-2* T-DNA (Hintergrund der Komplementationslinien), sowie das eingebrachte Komplementationskonstrukt (Komp.-Konstrukt). Als Positivkontrolle (+) wurde ein pCambia3301\_*GUN4*(WT) Plasmid, als Negativkontrolle (-) Wasser eingesetzt. (C) Expression des *GUN4* in den Komplementationslinien angezogen für 14 Tage im Kurztag bei  $120 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Die Ernte erfolgte 2h nach Belichtungsbeginn. Die Berechnung der Expression erfolgte relativ zur WT-Kontrolle (Col-0) und den Referenzgenen *SAND* und *PEX4* ( $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ ). Daten sind als Mittelwert  $\pm$ SEM für  $n=4$  gezeigt. Der Austausch der Phosphorylierungsstelle des *GUN4* zu Asparat (D; Phosphomimikry) führte zu einem chlorotischen Phänotyp. Teile dieser Abbildung wurden in Richter et al. (2016b) veröffentlicht.

Auch für das *GUN4-D*-Konstrukt, das für *GUN4*(S264D) kodierte, wurden homozygote Linien im *gun4-2* Hintergrund isoliert (Abbildung 3.13 A). Die hier gezeigten Linien sind durch die Abwesenheit des WT-Allels und die Anwesenheit der *gun4-2* T-DNA, sowie des Komplementationskonstruktes charakterisiert (Abbildung 3.10 B). In Abhängigkeit von der Position im Genom und der Anzahl der Insertionen ergaben sich unterschiedliche Expressionslevel für das Transgen in den *gun4-2/GUN4-D* Linien im Vergleich zu Col-0 (Abbildung 3.13 C). Interessanterweise führte die Expression von *GUN4-D* im *gun4-2* Hintergrund zu einem hellgrünen Phänotyp (Abbildung 3.13 A). Im Vergleich zu den Kontrolllinien (*GUN4-WT* und *GUN4-I*) führte der Austausch der Phosphorylierungsstelle gegen Asparat lediglich zu einer unvollständigen Komplementation der weißen *gun4-2* Mutante (Abbildung 3.13 A).





**Abbildung 3.14: Analyse der Intermediate und Endprodukte der TBS in *gun4-2* Komplementationslinien (GUN4(WT):GUN4-WT, GUN4(S264I):GUN4-I, GUN4(S264D):GUN4-D).**

Die Pflanzen wurden für 14 Tage im Kurztag bei 120  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  angezogen. Die Ernte erfolgte 2h nach Belichtungsbeginn. (A) MgP, (B) MgPMME, (C) Pchlido, (D) Häm, (E) Gehalt von Chlorophyll (Chl) a und b, (F) Chl a zu b-Verhältnis. TM= Trockenmasse. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$ S.D. für n=4 gezeigt. Diese Abbildung wurde in Richter et al. (2016b) veröffentlicht.

Wie sich herausstellte, waren die *steady state* Gehalte von MgP, dem Produkt der MgCh, und von MgPMME und Pchlido in den *gun4-2/GUN4-D* Linien im Vergleich zu Col-0 und den Kontrolllinien stark reduziert (zwischen <40% des WT-Gehaltes; Abbildung 3.14 A-C). Während die Häm-Gehalte nicht beeinflusst waren (Abbildung 3.14 D), zeigten sich eine deutliche Abnahme des Chl-Gehaltes in den *gun4-2/GUN4-D* Linien (Abbildung 3.14 E), sowie eine Zunahme des Chl a/b-Verhältnisses (Abbildung 3.14 F). Im Vergleich zu den Kontrolllinien akkumulierten die *gun4-2/GUN4-D* Linien weniger als 50% der Chl-Menge des WT. Diese Beobachtung steht im Einklang mit dem chlorotischen Phänotyp der *gun4-2/GUN4-D* Linien (Abbildung 3.13 A). Das Chl a/b-Verhältnis stieg auf 4-4,8 (Col-0: 3,2), was auf eine präferentielle Abnahme des Chl b in den *gun4-2/GUN4-D* Linien hindeutete.

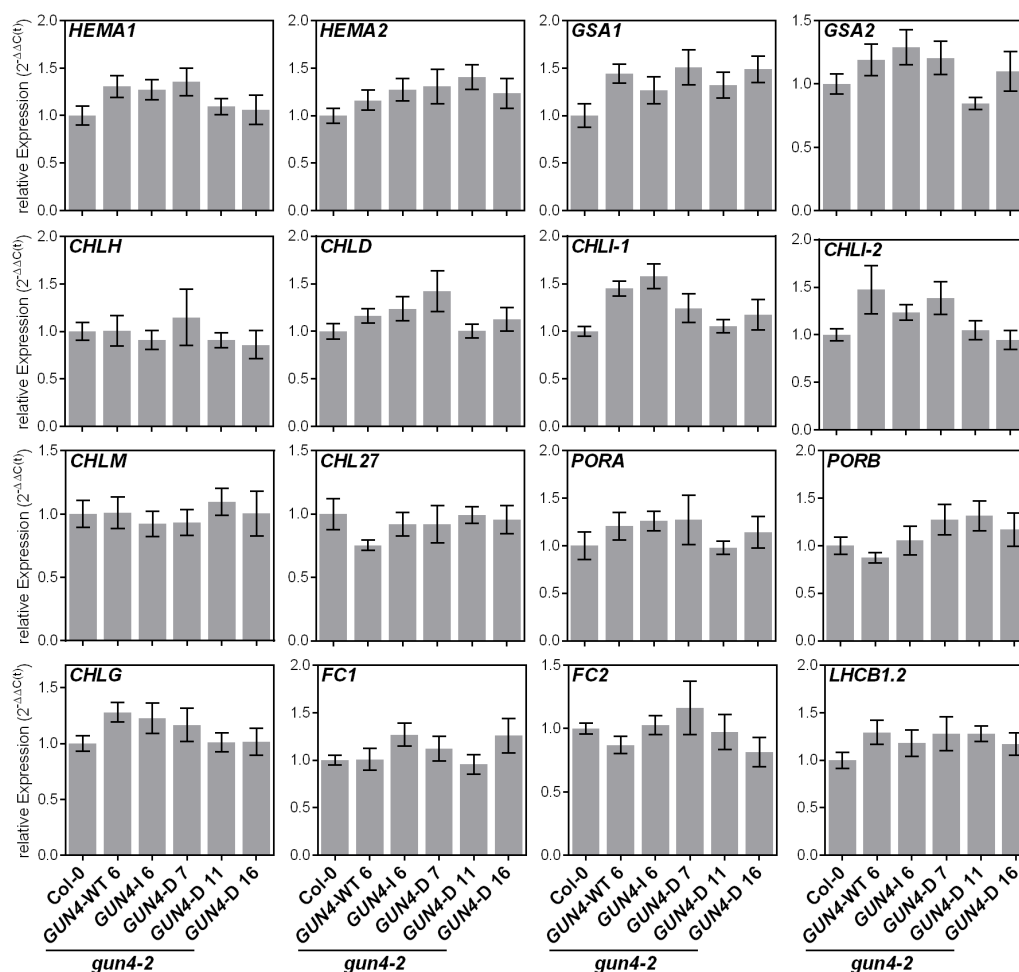
### 3.3.1 Genexpression und Proteingehalte der an der TBS beteiligten Enzyme in

#### *gun4-2/GUN4-D* Linien

Es stellte sich die Frage, ob die unvollständige Komplementation der *gun4-2 knockout* Mutante durch *GUN4-D* Konstrukte die Folge einer veränderten Transkription und Akkumulation von an der TBS beteiligten Genen und Proteinen war. Daher wurde die Expression dieser Gene in den *gun4-2/GUN4-D* Linien im Vergleich zu Col-0 und weiteren Kontrolllinien (*GUN4-WT* und *GUN4-I*) analysiert (Abbildung 3.15). Die Anzucht der Pflanzen erfolgte im Kurztag unter Standardbedingungen.

Diese Analysen zeigten, dass die Gene, die für frühe Schritte der TBS (*HEMA1/2*, Glutamyl-tRNA Reduktase und *GSA1/2*, Glutamat-1,2-Semialdehydtransferase) kodieren nicht in veränderten Mengen gebildet wurden (Abbildung 3.15). Auch die Gene, die für späte Schritte der Chl-Synthese kodieren (*CHLM*, MgP Methyltransferase; *CHL27*, katalytische Untereinheit der oxidativen Cyclase oder *PORA/B*, Protochlorophyllid Oxidoreduktase A/B; *CHLG*, Chlorophyllsynthase) wurden auf WT-Niveau in den *gun4-2/GUN4-D* Linien exprimiert (Abbildung 3.15). Ferner konnte in den *gun4-2/GUN4-D* Linien keine Veränderung der Expression beider Ferrochelatase (*FC1/2*), die die Häm-Synthese einleiten, festgestellt werden. Die Transkription eines Lichtsammelkomplex-Proteins (*LHCB1.2*) war im Vergleich zu den Kontrollen ebenfalls unverändert.

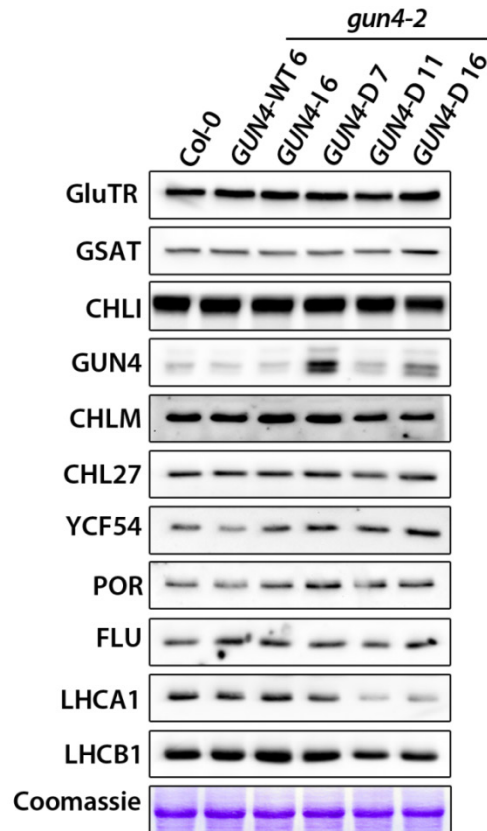
Besonders hervorzuheben ist, dass die mRNA-Gehalte der MgCh-Untereinheiten H, D, I (*CHLH*, *D*, *I*) durch das *GUN4*-Phosphomimikry weder positiv noch negativ beeinflusst wurden (Abbildung 3.15).



**Abbildung 3.15: Analyse der Genexpression von an der TBS beteiligten und assoziierten Proteinen in *gun4-2* Komplementationslinien (GUN4(WT):GUN4-WT, GUN4(S264I):GUN4-I, GUN4(S264D):GUN4-D).**

Die Pflanzen wurden für 14 Tage im Kurztag bei  $120 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  angezogen. Die Ernte erfolgte 2h nach Belichtungsbeginn. Die Berechnung der Expression erfolgte relativ zur WT-Kontrolle (Col-0) und den Referenzgenen *SAND* und *PEX4* ( $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ ). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$ SEM für  $n=4$  gezeigt. Erläuterungen zu den analysierten Genen im Text. Die Daten dieser Abbildung wurden in Richter et al. (2016b) veröffentlicht.

Wie schon für die Genexpression gezeigt, veränderten sich auch die Gehalte der an der TBS beteiligten Proteine nicht. Lediglich für GUN4, LHCB1 und LHCA1 konnten vom WT abweichende Proteinmengen in den *gun4-2*/GUN4-D Linien nachgewiesen werden (Abbildung 3.16). Die GUN4-D 7 Linie akkumulierte die größte Menge von GUN4 im Vergleich zu den Kontrolllinien, gefolgt von der GUN4-D 16 und der GUN4-D 11 Linie, wobei letztere einen WT-artigen GUN4-Gehalt aufwies (Abbildung 3.16). Die Menge an detektiertem GUN4-Protein korrelierte mit der Expression von GUN4 (Vergleich Abbildung 3.13 C). Bedingt durch die verminderte Synthese von Chl und bekräftigt durch die Zunahme des Chl a/b-Verhältnisses, akkumulierten alle analysierten *gun4-2*/GUN4-D Linien weniger LHC-Proteine (Abbildung 3.16).



**Abbildung 3.16:** Western-Blot-Analyse der von an der TBS beteiligten und assoziierten Proteinen in *gun4-2* Komplementationslinien (GUN4(WT):*GUN4*-WT, GUN4(S264I):*GUN4*-I, GUN4(S264D):*GUN4*-D).

Die Pflanzen wurden für 14 Tage im Kurztag bei  $120 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  angezogen. Die Ernte erfolgte 2h nach Belichtungsbeginn. Diese Abbildung wurde in Richter et al. (2016b) veröffentlicht.

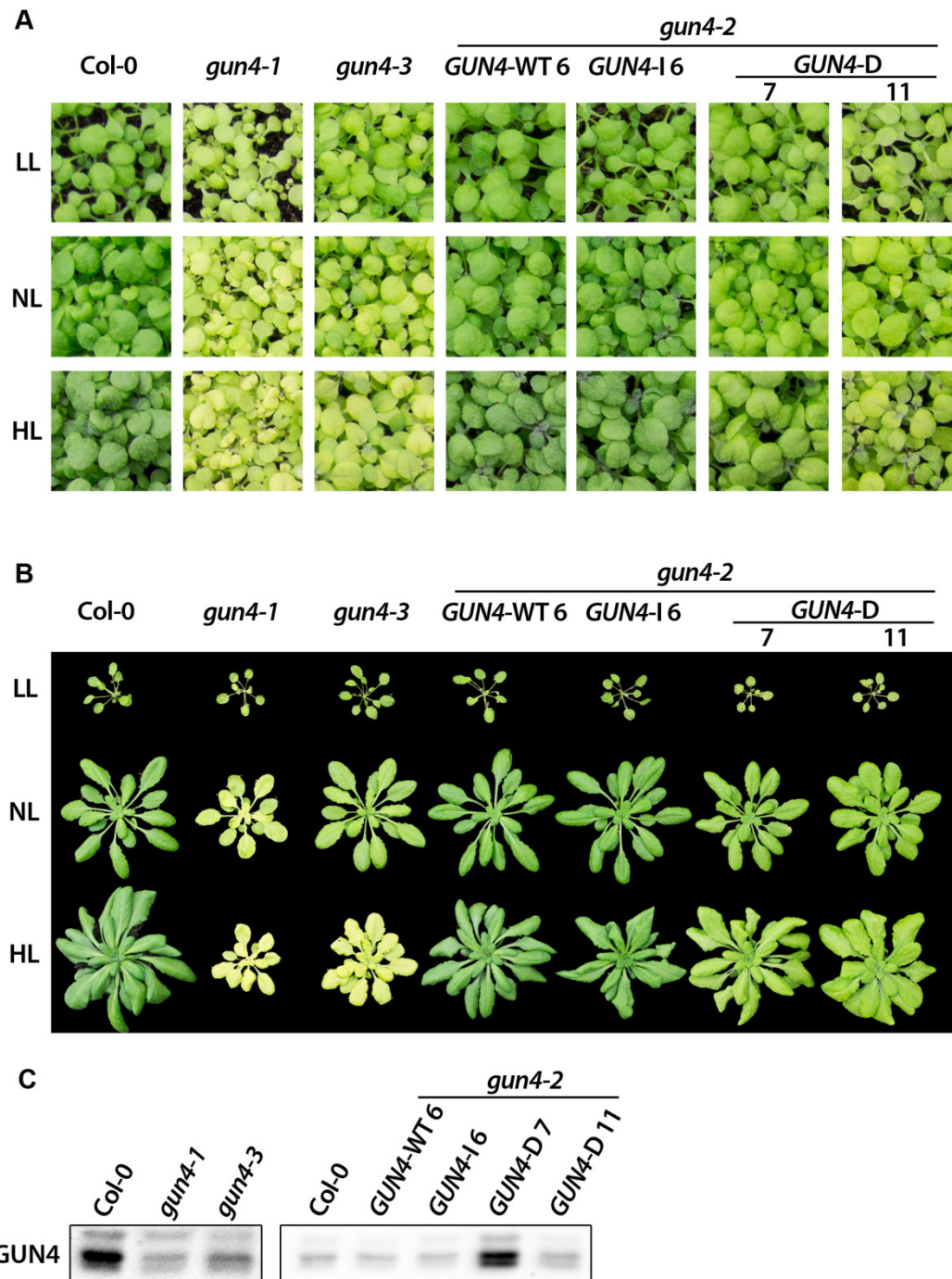
Anhand der gezeigten Ergebnisse lässt sich zusammenfassen, dass das Vortäuschen der Phosphorylierung von GUN4 im Pflanzenhintergrund zu einer Beeinträchtigung der TBS führte. Jedoch war diese nicht mit einer veränderten Expression oder Akkumulation der analysierten TBS Proteine zu erklären. Anders als *gun4 knockdown* Mutanten (siehe folgender Abschnitt) zeigten die *gun4-2/GUN4*-D Linien eine Limitation in der TBS, obwohl das GUN4-Protein präsent war. Es war davon auszugehen, dass es sich bei den beobachteten Effekten in den *gun4-2/GUN4*-D Linien um die Folge einer post-translationalen Veränderung der Aktivität von TBS Enzymen handelte.

### 3.3.2 Vergleichende Analyse von *gun4-2* Komplementationslinien mit *gun4 knockdown*

#### Mutanten

Die zuvor dargelegten Untersuchungen deuteten auf einen negativen Einfluss der Phosphorylierung auf die Funktion des GUN4-Proteins hin. Da bereits bekannt war, dass die *GUN4* Expression und GUN4 Akkumulation bis zu einer Lichtintensität von circa  $120 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  zunimmt und sich der *knockdown* von GUN4 weniger stark auswirkt, wenn *gun4* Mutanten im Schwachlicht angezogen werden (Peter und Grimm, 2009), wurde der physiologische Einfluss von GUN4(S264D) auf die TBS unter variierenden Lichtintensitäten analysiert (Abbildung 3.17 und Abbildung 3.18).

Für dieses Experiment wurden Col-0, zwei *gun4 knockdown* Mutanten (*gun4-1* und *gun4-3*; Abschnitt 1.6, S.37), sowie die mit *GUN4*-WT, *GUN4*-I und *GUN4*-D komplementierten *gun4-2* Linien im Schwachlicht, Normallicht und Hochlicht angezogen.

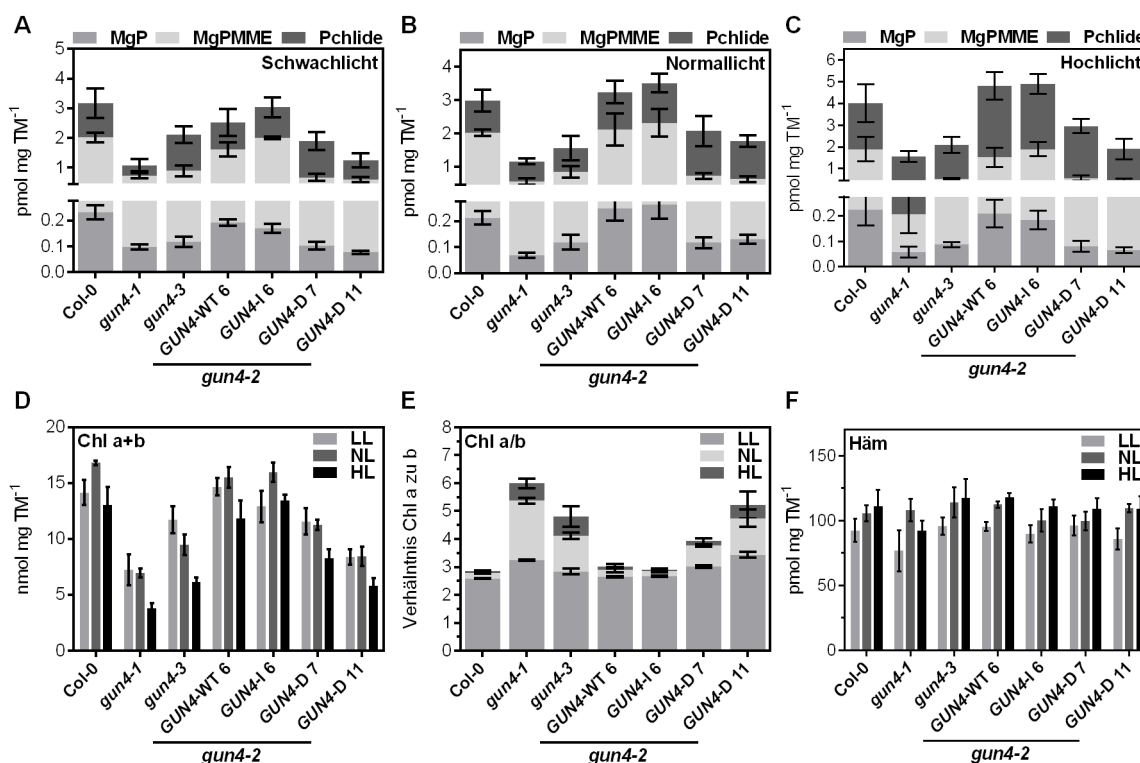


**Abbildung 3.17: Vergleichende Analyse des Phänotyps der *gun4-2* Komplementationslinien komplementiert mit genomischen *GUN4*-Konstrukten (*GUN4*(WT):*GUN4*-WT, *GUN4*(S264I):*GUN4*-I und *GUN4*(S264D):*GUN4*-D) und den *gun4-1* und *gun4-3* Mutanten.**

Die Pflanzen wurden für 14 Tage im Kurztag im Normallicht (NL, 130  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) angezogen und anschließend für (A) 5 Tage oder (B) 5 Wochen im Kurztag bei NL, Schwachlicht (LL, 20  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und Hochlicht (HL, 300  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) inkubiert. (C) Western-Blot-Analyse (*GUN4*-Gehalt) der Pflanzen aus (A, NL). Diese Abbildung wurde in Richter et al. (2016b) veröffentlicht.

Die *gun4-2*/*GUN4*-D Linien zeigten unter allen Lichtintensitäten einen hellgrünen Phänotyp, der beim WT Col-0 und den WT-artigen Kontrolllinien (*GUN4*-WT und *GUN4*-I) nicht feststellbar war (Abbildung 3.17 A). Dabei nahm das Ausmaß der Chl-Minderung mit steigender Lichtintensität zu (Abbildung 3.17 A und B). Auffällig war, dass die reduzierte Pigmentierung und die Wachstumsverzögerung der

*gun4* knockdown Mutanten im Vergleich zu den *GUN4-D* Linien im Hochlicht stärker ausgeprägt waren (Abbildung 3.17 B).



**Abbildung 3.18: Vergleichende Analyse der Tetrapyrrol-Gehalte der *gun4-2* Mutanten komplementiert mit genomischen *GUN4*-Konstrukten (*GUN4-WT*, *GUN4-I* und *GUN4-D*) und den *gun4-1* und *gun4-3* Mutanten.**

Die Pflanzen wurden für 14 Tage im Kurztag im Normallicht (NL,  $130 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) angezogen und anschließend für 5 Tage im Kurztag bei NL, Schwachlicht (LL,  $20 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und Hochlicht (HL,  $300 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) inkubiert. Die Ernte erfolgte 2h nach Belichtungsbeginn. (A-C) Porphyringehalte im LL, NL beziehungsweise HL. (D) Gehalt von Chl a und b, (E) Chl a zu b-Verhältnis, (F) Häm-Gehalt. TM= Trockenmasse. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  S.D. für  $n=4$  gezeigt. Diese Abbildung wurde in Richter et al. (2016b) veröffentlicht.

Die mit steigender Lichtintensität beobachtete graduelle Zunahme des hellgrünen Phänotyps der *gun4-1*, *gun4-3* und *gun4-2/GUN4-D* Linien wurde durch eine Abnahme der Gehalte von Porphyrinintermediaten (Abbildung 3.18 A-C) und einer Abnahme des Chl-Gehaltes relativ zu Col-0 begleitet. Die Expression von *GUN4-D* in der *gun4-2* Mutante führte im Mittel zu 85%, 70% beziehungsweise 50% WT-Chl-Gehalt im Schwach-, Normal- und Hochlicht (Abbildung 3.18 D). Die gleiche Tendenz zeichnete sich auch für die *gun4-3* Mutante, nicht aber für die stärkeren *GUN4* knockdown Mutanten (*gun4-1*) ab. Letztere wies bereits im Schwachlicht eine 50%ige Reduktion des Chl-Gehaltes auf, welcher im Starklicht auf unter 30% des WT-Wertes sank. Während die Reduktion des *GUN4*-Gehaltes (*gun4-1* und *gun4-3*), bzw. die Fehlfunktion von *GUN4* (*GUN4-D*) eine Zunahme des Chl a/b-Verhältnis mit zunehmender Lichtintensität zur Folge hatten (Abbildung 3.18 E), blieben die Häm-Gehalte in allen *gun4-2* Komplementationslinien nahezu konstant (Abbildung 3.18 F). In den Komplementationslinien, wie auch im WT, war eine leichte Tendenz zur Akkumulation von Häm mit

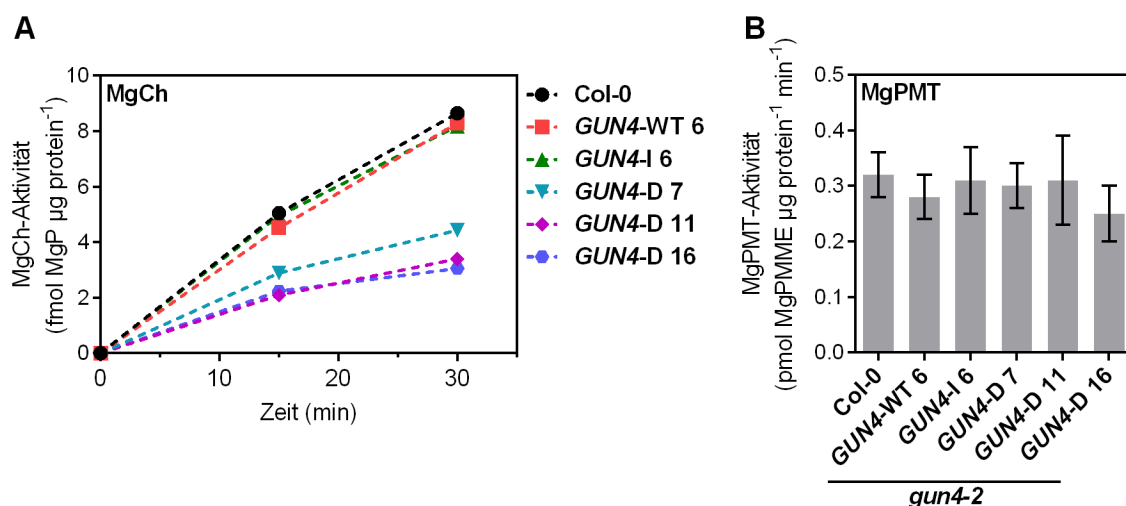
steigender Lichtintensität zu beobachten. Im Gegensatz zu den *GUN4-D* wurden für die *gun4-2/GUN4-WT* und *gun4-2/GUN4-I* Linien weder ein makroskopisch sichtbarer Verlust der Pigmentierung (Abbildung 3.17), noch eine Veränderung der Gehalte an TBS Intermediaten und der Endprodukte (Abbildung 3.18) in den variierenden Lichtbedingungen festgestellt.

Aus der vergleichenden Analyse der *gun4-1*, *gun4-3* Mutanten mit den *gun4-2/GUN4-D* Linien ergab sich somit, dass unter den gewählten experimentellen Bedingungen ein verminderter Fluss von Intermediaten in den Chl-, jedoch nicht in den Häm-Zweig der TBS vorlag. Ferner ließen die mit den *gun4 knockdown* Mutanten vergleichbaren Phänotypen der *GUN4-D* Linien unter steigender Lichtintensität den Schluss zu, dass sich möglicherweise eine Veränderung der MgCh-Aktivität in den *GUN4-D* Linien für den beobachteten lichtintensitätsabhängigen Phänotyp verantwortlich zeichnet.

### 3.3.3 In vivo und in vitro Analyse der MgCh- und MgPMT-Aktivität in *gun4-2*

#### Komplementationslinien

Da bereits bekannt war, dass GUN4 einen stimulierenden Einfluss auf die MgCh ausübt (siehe Einleitung) und die post-translationale Modifikation der Phosphorylierung einen Einfluss auf die Funktion von GUN4 nehmen könnte, war es naheliegend, die MgCh-Aktivität in den chlorotischen *gun4-2/GUN4-D* Linien zu ermitteln.



**Abbildung 3.19: In vivo Aktivität der MgCh und MgP-Methyltransferase (MgPMT) im WT und verschiedenen *gun4-2* Komplementationslinien.**

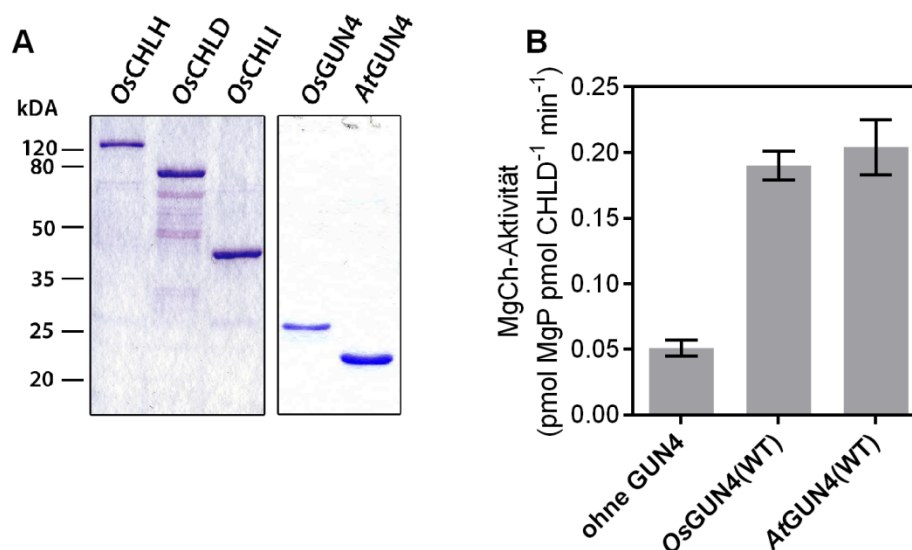
(A) MgCh und (B) MgP Methyltransferase (MgPMT). Enzymaktivitäten wurden in Extrakten von 21 Tage alten Col-0 und *gun4-2* Komplementationslinien bestimmt. Die Pflanzen wurden im Kurztag bei  $120 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  angezogen. (A) Daten sind als Mittelwert für  $n=2$  unabhängige Proben eines Experimentes gezeigt. (B) Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  S.D. für  $n=3$  gezeigt. Die Experimente wurden wiederholt und ein repräsentatives Ergebnis ist gezeigt. Teile dieser Abbildung wurden in Richter et al. (2016b) veröffentlicht.

Für die Analyse der MgCh-Aktivität wurden Extrakte des WT (Col-0) und der *gun4-2* Komplementationslinien (siehe Abbildung 3.19 A) erstellt und die Bildung des Produktes der MgCh-



Reaktion, MgP, im Rahmen einer Kinetik ermittelt. Dabei zeigte sich, dass die *GUN4*-WT und *GUN4*-I Linien dieselbe MgP-Bildungsrate wie die WT-Kontrolle aufwiesen. Im Gegensatz zu den Kontrolllinien, war die Bildungsrate von MgP durch Extrakte der *GUN4*-D Linien 7, 11 und 16 deutlich geringer (Abbildung 3.19 A). Die Anwesenheit der Phosphomimikry-Variante des GUN4 in *gun4-2* führte zu einer Reduktion der MgCh-Aktivität *in vivo*. Die Aktivität der MgP-Methyltransferase (MgPMT/CHLM) hingegen wurden weder durch die Anwesenheit des GUN4(S264D) noch des GUN4(S264I) Proteins beeinflusst (Abbildung 3.19 B).

Um die Annahme zu bestätigen, dass das Phosphomimikry von GUN4 Ursache für die Verminderung der MgCh-Aktivität ist, wurde der Einfluss von GUN4(S264D) auf die *in vitro* MgCh-Aktivität untersucht. Für dieses Experiment konnte auf die bereits publizierten rekombinanten Reis MgCh-Untereinheiten (*Oryza sativa*, *Os*) zurückgegriffen werden (Zhou et al., 2012). Die MgCh-Untereinheiten wurden in *E.coli* exprimiert und unter Nutzung des HIS-Tag aufgereinigt (Abbildung 3.20 A). Da in dieser Arbeit vorangig mit dem GUN4 aus *Arabidopsis* gearbeitet wurde, musste zunächst überprüft werden, ob das *Os*GUN4(WT) durch das *At*GUN4(WT) Protein in einem *in vitro* MgCh-Assay ersetzt werden konnte.

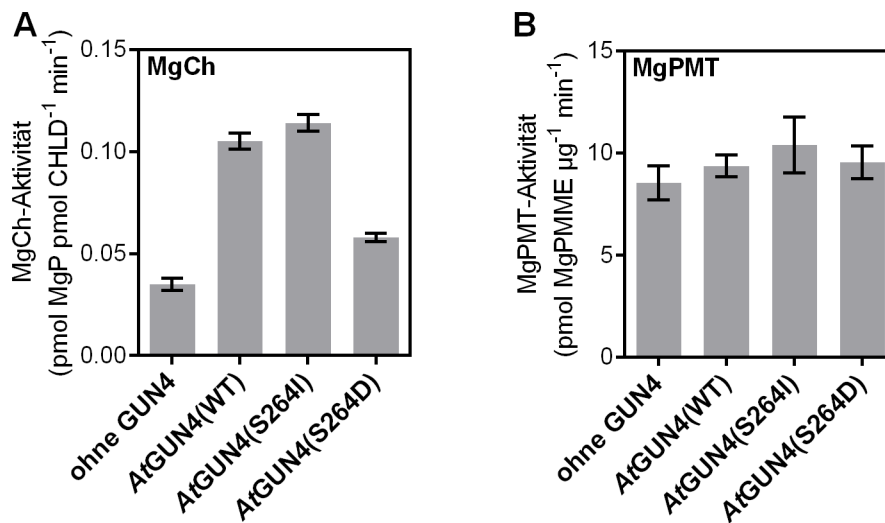


**Abbildung 3.20: *In vitro* MgCh-Assay mit Reis (*Oryza sativa* (*Os*)) und *Arabidopsis* (*At*)GUN4.**

(A) Coomassie gefärbtes SDS-Gel (12%) der rekombinanten Untereinheiten exprimiert in *E.coli* und aufgereinigt unter Nutzung des N-terminalen HIS-tag. CHLH,D,I = MgCh Untereinheiten H, D, I. (B) MgCh-Assay mit rekombinanten *Os* und *At*GUN4. Diese Abbildung wurde in Richter et al. (2016b) veröffentlicht.

Es zeigte sich, dass die MgCh in Abwesenheit von GUN4 eine basale Aktivität hatte. In Anwesenheit von *Os*GUN4 konnte diese Aktivität ungefähr um das 4-fache gesteigert werden (Abbildung 3.20 B). Wurde anstelle des *Os*GUN4(WT) das homologe *Arabidopsis* Protein (*At*GUN4(WT)) eingesetzt, zeigte

sich ein vergleichbarer stimulatorischer Effekt (Abbildung 3.20 B). Somit konnte dieses Assay-System für die eingehende Analyse des AtGUN4 und seiner Mutanten genutzt werden.



**Abbildung 3.21:** Einfluss von rekombinantem *Arabidopsis* (At)GUN4(WT), AtGUN4(S264I) bzw. AtGUN4(S264D) auf die *in vitro* Aktivität der MgCh aus Reis und MgP Methyltransferase (MgPMT) aus *Arabidopsis*.

(A) MgCh und (B) MgP-Methyltransferase (MgPMT)-Aktivität. Die Enzymaktivitäten wurden mit den rekombinant exprimierten und aufgereinigten Proteinen bestimmt. Für (B) wurden äquimolare Mengen von MgPMT und GUN4 eingesetzt. Teile dieser Abbildung wurden in Richter et al. (2016b) veröffentlicht.

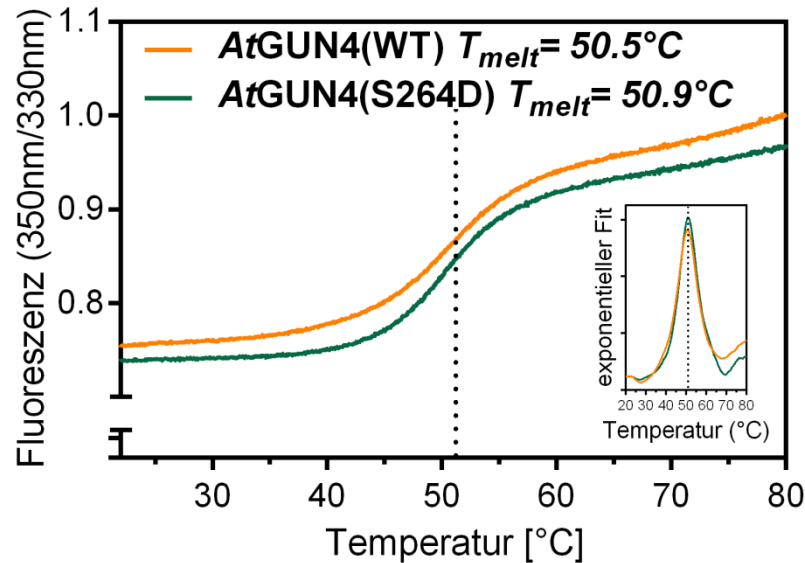
Die Anwesenheit des GUN4(S264D) Proteins führte zu einer geringeren Stimulation der *in vitro* MgCh-Aktivität. Im Vergleich zum GUN4(WT) und GUN4(S264D), stimulierte die Phosphomimikry-Variante des GUN4 die MgCh lediglich um 40% im Vergleich zur Reaktion ohne GUN4 und im Vergleich zum GUN4(WT) Protein (ca. 3-4fach) (Abbildung 3.21 A). Die Reaktion der rekombinanten MgPMT hingegen wurde weder positiv noch negativ durch die Anwesenheit einer der GUN4-Varianten beeinflusst (Abbildung 3.21), was die Ergebnisse aus den Blattextrakten bestätigt (Abbildung 3.19 B).

Damit konnte die Annahme bestätigt werden, dass die verminderte MgCh-Aktivität in den Blattextrakten der GUN4-D Linien (Abbildung 3.19) auf die Anwesenheit der Phosphomimikry-Variante des AtGUN4 zurückzuführen war. Die *in vitro* Analysen legten nahe, dass das Stimulationspotenzial von GUN4 für die MgCh-Aktivität durch die Phosphorylierung von GUN4 beeinflusst wurde.

### 3.4 Faltung und Porphyrinbindung rekombinanter GUN4-Proteine

Wann immer ein Aminosäureaustausch in einem Protein vorgenommen wird, muss sichergestellt sein, dass dieser Austausch keinen Einfluss auf die strukturelle Integrität des betreffenden Proteins hat. Daher war zu hinterfragen, ob der Austausch des Serins zu Aspartat in GUN4(S264D) zu einer Veränderung der 3-dimensionalen Struktur von GUN4, und in der Konsequenz zu der beobachteten verminderten Stimulationsfähigkeit der MgCh führte.

Im Gegensatz zur langwierigen Kristallisation, kann die Analyse der (thermischen) Entfaltung eines Proteins in kürzerer Zeit eine Auskunft über die strukturelle Integrität des analysierten Proteins geben. Im Falle der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der thermischen Denaturierung angewandt (in Kooperation mit K. Petersen, Targenomix GmbH, Potsdam-Golm). Hierfür wurde die intrinsische Fluoreszenz aromatischer Aminosäuren (bei Anregung mit 280 nm: Tryptophan (Trp) oder Tyrosin) der analysierten GUN4-Proteine aufgenommen. Diese wird durch die sie umgebenden Aminosäuren und Proteinstruktur beeinflusst. Veränderungen in der Proteinstruktur, wie zum Beispiel während der thermischen Entfaltung, führen zu einer Veränderung der Fluoreszenzintensität und des Emissionsspektrums der aromatischen Aminosäuren. So ist bei der Entfaltung eines Proteins eine Verschiebung des Trp-Emissionsspektrums von 330 nm zu 350 nm zu beobachten. Mit der Veränderung des Verhältnisses der Fluoreszenz von Trp bei 350 nm und 330 nm lässt sich daher die Entfaltung verfolgen. Alle Modifikationen an einem Protein, die zur Veränderung der Struktur führen, wie zum Beispiel die Bindung eines Moleküls oder ein strukturbeeinflussender Aminosäureaustausch, wirken sich auf die Schmelztemperatur aus.

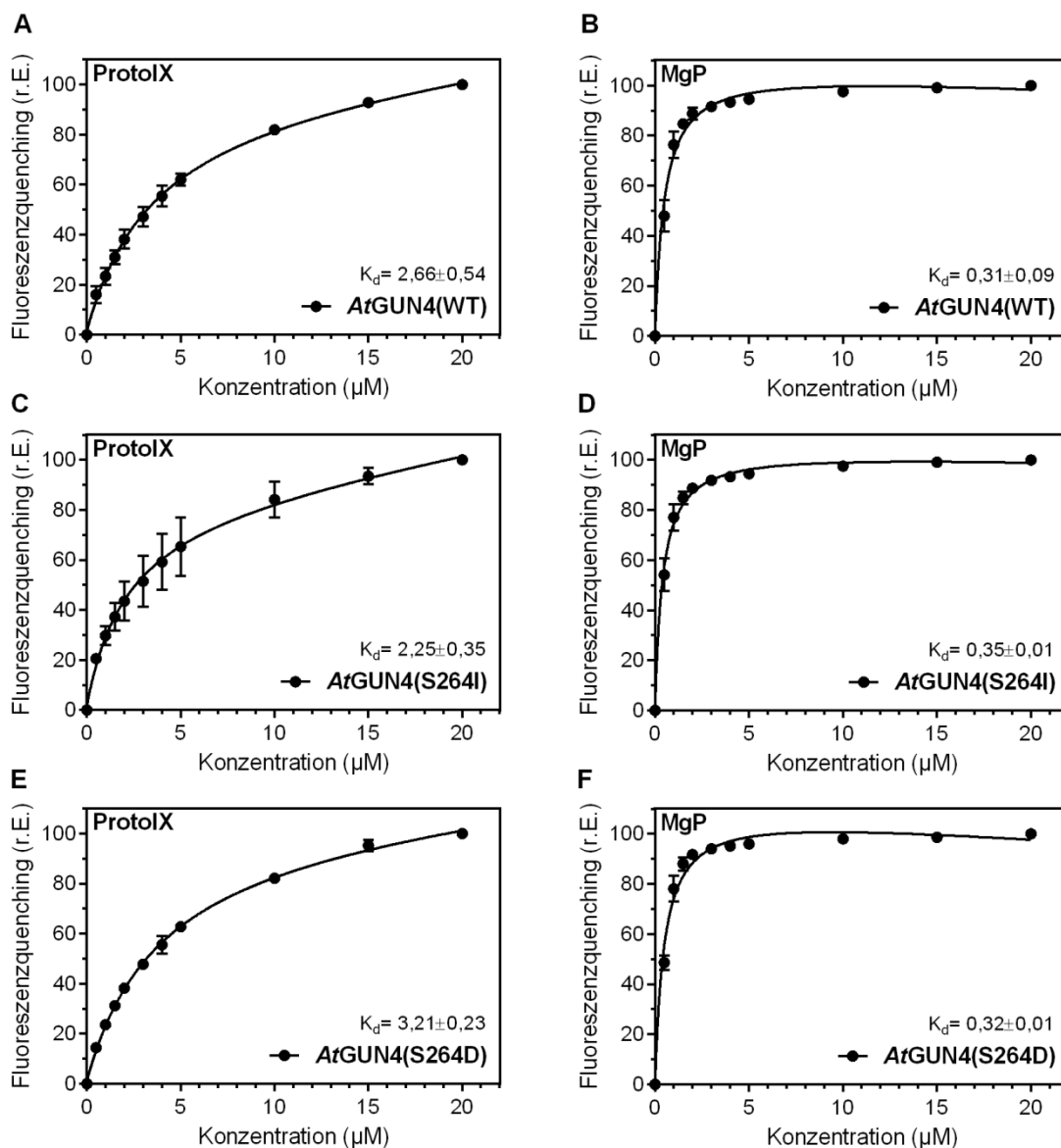


**Abbildung 3.22: Schmelzpunktanalyse als Maß der strukturellen Integrität der rekombinanten *Arabidopsis* (*At*)GUN4-Proteine.**

*At*GUN4(WT) (orange) und *At*GUN4(S264D) (grün). Gemessen wurde die intrinsische Fluoreszenz aromatischer Aminosäuren (hauptsächlich Tryptophan (Trp)). Die Schmelzkurve wurde aus dem Verhältnis der Emission von Trp bei 350 nm (entfaltet) zu 330 nm (gefaltet) bei ansteigender Temperatur bestimmt. Die Bestimmung der Schmelzpunkte bei der 50% der vorliegenden Proteine denaturiert vorlagen ( $T_{melt}$ , gepunktete Linie im Graph) erfolgte mittels exponentiellem Fit erster Ordnung (Einsatz in der Grafik) durch das verwendete Gerät (Prometheus NT.48) und Analysesoftware. Die angegebenen  $T_{melt}$  ergeben sich aus der Analyse von drei Verdünnungsstufen der GUN4-Proteine. Das *At*GUN4(S264D) Protein zeigte keinen veränderten Schmelzpunkt im Vergleich zum *At*GUN4(WT).

Die in Abbildung 3.22 gezeigte Schmelzpunktanalyse ergab, dass das *At*GUN4(S264D) im Vergleich zum WT-Protein annähernd die gleiche Schmelztemperatur wie das *At*GUN4(WT) Protein aufwies (+0,4 °C). Basierend auf diesem Ergebnis war nicht von einer Veränderung der Faltung sondern von der strukturellen Integrität des Phosphomimikry GUN4(S264D) auszugehen.

Eine zweite Möglichkeit zur vergleichenden Untersuchung der Faltung von *At*GUN4(WT) und *At*GUN4(S264D) nutzt die zuvor beschriebene Eigenschaft von GUN4 Porphyrine zu binden. Für die Bindung von ProtoIX an die MgCh wurde diese Methode erstmals von Karger et al. (2001) beschrieben und in den Folgejahren für die Analyse der Bindung von ProtoIX und MgP durch GUN4 verwendet (Larkin et al., 2003; Davison et al., 2005; Verdecia et al., 2005). Die Methode nutzt die Veränderung der intrinsischen Trp-Fluoreszenz im Zuge der Bindung von Molekülen an ein Protein. Im Falle der Bindung von ProtoIX und MgP an rekombinantes GUN4 wird das Maß der Bindung als Fluoreszenzquenching (Abnahme der Trp-Fluoreszenz bei steigender Ligandenkonzentration) ermittelt. Aus den aufgenommenen Fluoreszenzdaten bei variierender Porphyrinkonzentration lässt sich anschließend die Affinität ( $K_d$ ) der GUN4-Proteine gegenüber den einzelnen Porphyrinen ermitteln (Siehe Abschnitt 2.8.12.1, S.108).



**Abbildung 3.23: Porphyrinbindungsstudien mit rekombinantem *Arabidopsis* (*At*)GUN4(WT), *At*GUN4(S264I) und *At*GUN4(S264D).**

Die Veränderung der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz (Trp-Fluo; Anregung bei 280 nm, Emission bei 340 nm) wurde unter steigender Konzentration von ProtoIX (A,C,E) und MgP (B,D,F) gemessen. Das Maß der Bindung eines Liganden wurde als Zunahme des Quenchings dargestellt.  $n=3$  Messungen mit unterschiedlichen Proteinchargen. Die Trp-Fluo wurde für jede Konzentration in Triplikaten aufgenommen. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  S.D. über alle Messwerte angegeben. r.E.= relative Einheiten. Diese Abbildung wurde in Richter et al. (2016b) veröffentlicht.

Für die Porphyrinbindungsstudien wurde eine konstante Menge rekombinantes *At*GUN4(WT), *At*GUN4(S264I) oder *At*GUN4(S264D) mit zunehmender Menge von ProtoIX oder MgP inkubiert und die intrinsische Trp-Fluoreszenz gemessen. Dabei zeigte sich, dass der Austausch des Serins an der Position 264 zu Isoleucin oder Aspartat keinen Einfluss auf die Affinität von GUN4 gegenüber ProtoIX (Abbildung 3.23 A, C, E) und MgP (Abbildung 3.23 B, D, F) hatte. Für das *At*GUN4(WT) wurde für ProtoIX ein  $K_d = 2,66 \pm 0,54$  µM, für *At*GUN4(S264I) ein  $K_d = 2,25 \pm 0,35$  µM und für das *At*GUN4(S264D) ein  $K_d = 3,21 \pm 0,23$  µM ermittelt. GUN4 bindet MgP mit ungefähr 10fach höherer Affinität (10-fach geringerer  $K_d$ ). Für das *At*GUN4(WT) wurde gegenüber MgP ein  $K_d = 0,31 \pm 0,09$  µM, für *At*GUN4(S264I)

ein  $K_d = 0,35 \pm 0,01 \mu\text{M}$  und für das *AtGUN4(S264D)* ein  $K_d = 0,32 \pm 0,01 \mu\text{M}$  bestimmt. Die berechneten Affinitäten zu den Porphyrinen unterschieden sich nicht signifikant (Student'scher T-test) zwischen dem *AtGUN4(WT)* und den beiden Substitutionsmutanten *AtGUN4(S264I)* und *AtGUN4(S264D)*.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das Vortäuschen der Phosphorylierung keinen Einfluss auf die strukturelle Integrität des *GUN4(S264D)* hatte. Ferner wurde beobachtet, dass die Eigenschaft von *GUN4* Porphyrine zu binden, nicht durch den Austausch der Phosphorylierungsstelle zu Isoleucin oder Aspartat beeinflusst wurde.

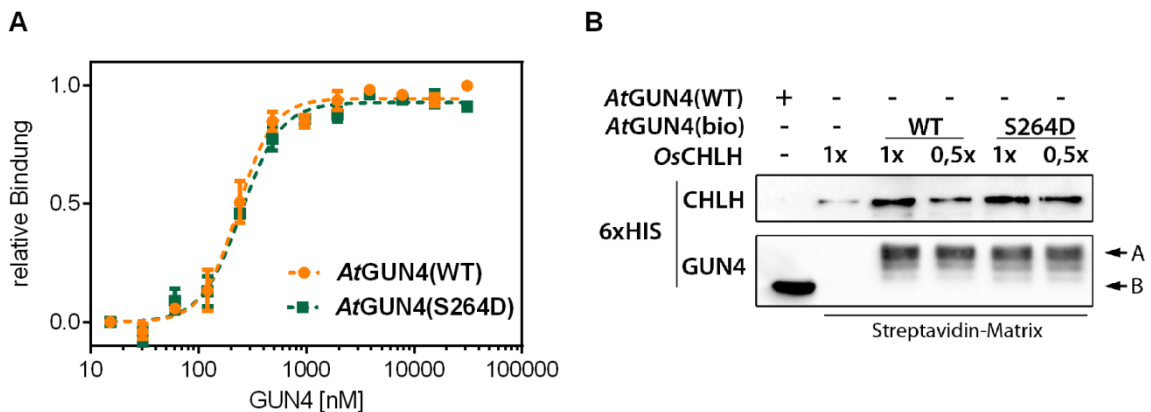
### 3.5 *In vitro* Bindungsstudien von CHLH und GUN4

Die bisher dargestellten *in vitro* und *in vivo* Experimente zum Einfluss von GUN4 auf die MgCh haben gezeigt, dass die Phosphorylierung von GUN4 die Stimulation der MgCh beeinflusst. Da die strukturellen Eigenschaften und die Porphyrinbindung nicht durch die GUN4-Phosphorylierung beeinflusst wurden, sollte mit den folgenden Experimenten der Versuch unternommen werden eine Erklärung für die veränderte Funktion von phosphoryliertem GUN4 zu finden. Es ist bekannt, dass das cyanobakterielle und pflanzliche GUN4 die MgCh Untereinheit H bindet (Larkin et al., 2003; Sobotka et al., 2008). Ferner ist bekannt, dass Proteinphosphorylierungen Protein-Proteinwechselwirkungen beeinflussen können (zum Beispiel Kim et al. (2004), Bonardi et al. (2005) und Bellafiore et al. (2005)). Folglich wurde spekuliert, dass die Phosphorylierung von GUN4 einen Einfluss auf Fähigkeit zur Interaktion mit CHLH ausübt.

Um diese Fragestellung näher zu untersuchen, wurden zwei verschiedene *in vitro* Methoden angewandt. Einerseits wurde die Bindung von GUN4 an CHLH mittels *microscale thermophoresis* quantitativ untersucht. Andererseits erfolgte eine semi-quantitative Analyse der GUN4-CHLH Interaktion in einem *pulldown* Experiment mit den aufgereinigten Proteinen.

Die *microscale thermophoresis* beruht auf folgendem Prinzip: Jedes Molekül, ob niedermolekulares Salz oder höhermolekulares Protein, bewegt sich in einem thermischen Feld entlang eines Temperaturgradienten (Thermophorese). Dabei wird die Geschwindigkeit der Bewegung maßgeblich durch die Größe, Ladung und Interaktion mit der (Lösungsmittel-) Umgebung des Moleküls beeinflusst. Die Geschwindigkeit der Thermophorese für ein monomeres Protein unterscheidet sich in der Regel von der Thermophoresegeschwindigkeit eines dimeren Proteinkomplexes. Im Rahmen eines Titrationsexperimentes kann dieser Unterschied in der Thermophorese genutzt werden, um die Interaktion zwischen zwei Molekülen (zum Beispiel GUN4 mit CHLH) quantitativ zu beschreiben. Im vorliegenden Experiment wurde eine konstante Menge fluoreszenzmarkiertes CHLH Protein aus Reis mit einer zunehmenden Menge an AtGUN4(WT) oder AtGUN4(S264D) inkubiert. Die Geschwindigkeit der Abnahme der Fluoreszenz im Messfenster (erwärmt durch einen Laser) wurde detektiert und diente als quantitatives Maß für die Interaktion zwischen GUN4 und CHLH (Abbildung 3.24 A).

Der kongruente Kurvenverlauf der Thermophorese-Signale für die WT- und Phosphomimikry-Version von GUN4 deutete auf eine unveränderte Bindung von AtGUN4(WT) oder AtGUN4(S264D) an OsCHLH hin (Abbildung 3.24 A). Die Bestimmung der Bindungskonstanten bestätigte dieses Ergebnis. Das AtGUN4(WT) hatte eine Affinität gegenüber CHLH von  $K_d = 230 \pm 14,5$  nM. Die für die Interaktion von AtGUN4(S264D) mit OsCHLH ermittelte Bindungskonstante von  $K_d = 249 \pm 13,4$  nM unterschied sich nicht signifikant von der des AtGUN4(WT) Proteins.



**Abbildung 3.24: Quantitative Untersuchung der Bindung von Reis (*Oryza sativa*, Os) CHLH an *Arabidopsis* (At)GUN4(WT) und AtGUN4(S264D).**

(A) Bestimmung der Bindungskonstanten zwischen *OsCHLH* und AtGUN4(WT), sowie AtGUN4(S264D) mittels *microscale thermophoresis*. Eine konstante Menge fluoreszenzmarkiertes *OsCHLH* wurde mit einer zunehmender Menge GUN4-Protein inkubiert und die relative Bindung als Veränderung der Laufeigenschaft, bei vorliegender Interaktion, während der Thermophorese gemessen (Veränderung der Fluoreszenzintensität im Messfenster). Daten sind gezeigt als Mittelwert  $\pm$ S.D. für  $n=5$  Messungen mit 2 unabhängigen Proteinaufreinigungen und je 3 technischen Replikaten. (B) Semiquantitative Untersuchung der Bindungskapazität von *OsCHLH* an AtGUN4(WT) sowie AtGUN4(S264D). Eine konstante Menge biotinyliertes (bio) AtGUN4(WT) oder AtGUN4(S264D) wurde im Verhältnis 1x GUN4:1x CHLH (1x, Spur 3 und 5), beziehungsweise 1xGUN4:0,5x CHLH (0,5x, Spur 4 und 6) mit der Streptavidin-Matrix inkubiert, gewaschen und eluiert. Kontrollen: nicht-biotinyliertes AtGUN4(WT)-Protein ohne Inkubation mit der Streptavidin-Matrix (Spur 1), sowie 1x *OsCHLH* inkubiert mit der Streptavidin-Matrix (Spur 2). A= biotinyliertes GUN4, B= nicht-biotinyliertes GUN4. Die Analyse erfolgte mittels Western-Blot und 6xHIS-Antikörper, der den HIS-tag der rekombinanten Proteine detektiert. Die Signale der rekombinanten Proteine wurden auf derselben Membran detektiert, mussten jedoch für die Darstellung und Kontrastanpassung ausgeschnitten werden. AtGUN4(S264D) bindet *OsCHLH* mit derselben Affinität wie AtGUN4(WT).

Zusätzlich wurde die physikalische Interaktion des GUN4 mit CHLH in einem unabhängigen *pulldown* Experiment untersucht. Für dieses Experiment wurden biotinylierte GUN4-Proteine an eine Streptavidin-Matrix gebunden und anschließend mit zwei unterschiedlichen Mengen *OsCHLH* inkubiert. Nach der Elution wurde deutlich, dass das *OsCHLH* auch ohne Biotinylierung an die Matrix binden konnte (Abbildung 3.24 B). Im Gegensatz zu dieser Kontrolle zeigte sich jedoch ein wesentlich stärkeres Signal für *OsCHLH*, wenn die Matrix zuvor mit den GUN4-Proteinen beladen wurde. Die Signalintensitäten für das eluierte CHLH, das mit AtGUN4(WT) oder AtGUN4(S264D) inkubiert wurde, unterschieden sich dabei nicht (Abbildung 3.24 B). Folglich war die Bindungskapazität gleich. Auch aus der Bindungsstudie mit den aufgereinigten CHLH und (biotinylierten) GUN4-Proteinen, ergaben sich keine Hinweise auf eine Veränderung der Interaktion von AtGUN4(S264D) mit *OsCHLH* im Vergleich zum AtGUN4(WT) (Abbildung 3.24 B).



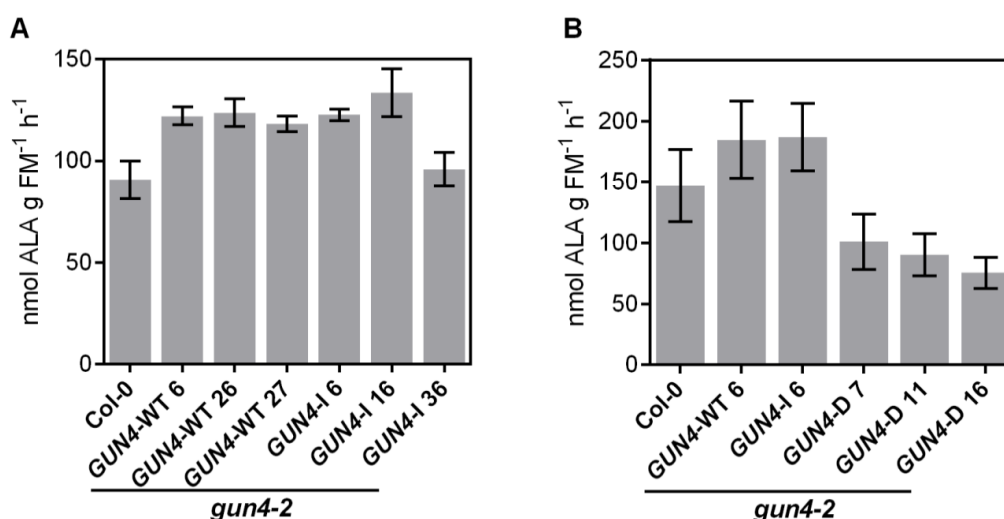
### 3.6 Vergleichende Analysen von *gun4-2* Komplementationslinien

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden *gun4-2* Mutanten erzeugt, die das GUN4(WT), GUN4(S264I) sowie das GUN4(S264D) Protein exprimierten. Die in den *gun4-2/GUN4-D* Linien nachgewiesene Einschränkung der MgCh-Reaktion führte zu einem geringeren Chl-Gehalt. Die *gun4-2/GUN4-I* Linien hingegen waren im Vergleich zu den *gun4-2/GUN4-WT* Linien phänotypisch unauffällig.

Um die physiologische (biochemische) Funktion von GUN4 und dessen Phosphorylierung, insbesondere unter Stressbedingungen, genauer zu evaluieren, wurden hierzu ergänzende Untersuchungen durchgeführt.

#### 3.6.1 Analyse der ALA-Synthesekapazität in *gun4-2* Komplementationslinien

Die Expression von GUN4(S264D) im *gun4-2 knockout* Hintergrund führte im Vergleich zu den Kontrolllinien zu einer Abnahme der MgP, MgPMME und Pchl *steady state* Level (Abbildung 3.14, S.141). Auffällig war dabei, dass unter keiner der gewählten Bedingungen trotz reduzierter MgCh-Aktivität eine Akkumulation von ProtoIX, dem Substrat der MgCh, beobachtet werden konnte. Dies galt auch für die analysierten *gun4-1* und *gun4-1 knockdown* Mutanten. Da bekannt war, dass *gun4* Mutanten durch eine reduzierte Kapazität des ratenlimitierenden Schrittes der ALA-Synthese charakterisiert sind (Peter und Grimm, 2009), wurde der Einfluss der GUN4-Phosphorylierung auf die ALA-Syntheseleistung untersucht (Abbildung 3.25).



**Abbildung 3.25: Analyse der ALA-Synthesekapazität in *gun4-2* Komplementationslinien.**

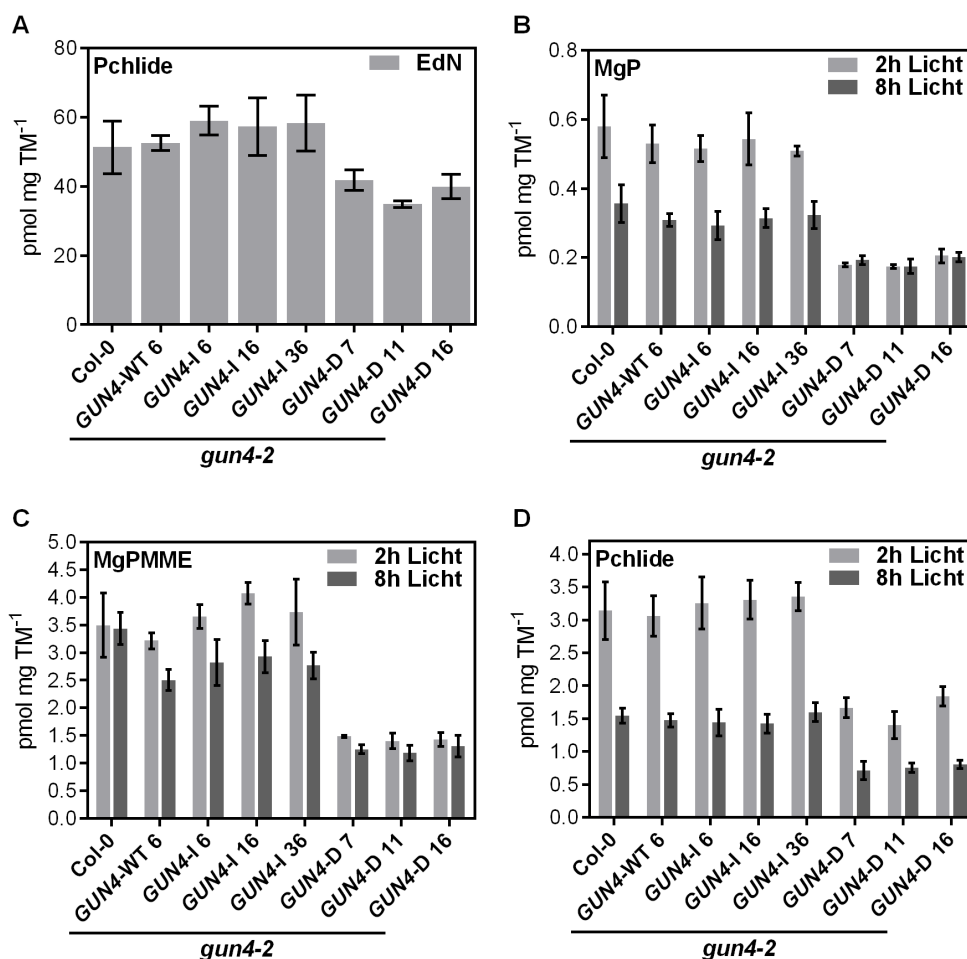
Die ALA-Synthesekapazität wurde in (A) *gun4-2/GUN4-WT* und *gun4-2/GUN4-I*, sowie in *gun4-2/GUN4-D* (B) Linien, angezogen für 21 Tage bei 120  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  im Kurztag, bestimmt. Die Messung wurde 2h nach Belichtungsbeginn begonnen. Daten sind gezeigt als Mittelwert  $\pm$  S.D., n=4. FM= Frischmasse. Die Daten dieser Abbildung wurden in Richter et al. (2016b) veröffentlicht.

Im Vergleich zu den *gun4-2/GUN4*-WT Linien führte auch der *knockout* der Phosphorylierungsstelle im GUN4 (*GUN4-I*) zu keiner Veränderung der ALA-Synthesekapazität (Abbildung 3.25 A). Die leicht erhöhte ALA-Synthesekapazität in *gun4-2/GUN4-I* Linien im Vergleich zu Col-0 wurde ebenfalls für die mit dem *GUN4*-WT-Konstrukt komplementierten *gun4-2* Mutanten beobachtet (Abbildung 3.25 A) und ist daher keine Folge des Verlustes der GUN4-Phosphorylierung. Vielmehr kann spekuliert werden, dass die im Vergleich zu Col-0 erhöhte *GUN4* Expression in diesen Linien (Vergleich Abschnitt 3.2, S.133) einen stimulatorischen Einfluss auf die ALA-Synthese nahm. Dies wurde bereits für *GUN4* Überexpresserlinien im Tabak gezeigt (Peter und Grimm, 2009). Obwohl eine mindestens WT-artige Expression des Transgens vorlag, zeigte sich eine 50%ige Reduktion der ALA-Synthesekapazität in *gun4-2/GUN4-D* Linien im Vergleich zu den parallel analysierten Kontrolllinien (Abbildung 3.25 B).

Die von phosphoryliertem GUN4 ausgehende verminderte Stimulation der MgCh führt zu einer *feedback* Regulation der ALA-Synthese. Das Ausbleiben der ProtoIX-Akkumulation ist somit eine Konsequenz der reduzierten ALA-Syntheseleistung in den *gun4-2/GUN4-D* Linien.

### **3.6.2 Untersuchung der Porphyrin-Akkumulation im Tagesverlauf**

Der Fluss der Intermediate in der TBS unterliegt starken Schwankungen im Verlauf eines Tages (Papenbrock et al., 1999). Für die Anpassungen der enzymatischen Aktivitäten unter variierenden Lichtbedingungen zeichnen sich unter anderem umfangreiche post-translationale Regulationsmechanismen verantwortlich (Abschnitt 1.7.3, S.43). Um den Einfluss der GUN4-Phosphorylierung auf diese Mechanismen zu untersuchen, wurden die (Mg-)Porphyringehalte zum Ende der Nacht, sowie zwei und acht Stunden nach Belichtungsbeginn in den *gun4-2* Komplementationslinien gemessen (Abbildung 3.26).



**Abbildung 3.26: Analyse der Mg-Porphyrin- und Pchlidgehalte im Verlauf eines Tag-Nacht-Zyklus.**

Untersucht wurden *gun4-2 knockout* Mutanten komplementiert mit genomischen Sequenzen, die für GUN4(WT) (*GUN4*-WT), GUN4(S264I) (*GUN4*-I) und GUN4(S264D) (*GUN4*-D) kodieren. 14-Tage alte Pflanzen (Kurztag, 120  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) wurden zu den angegebenen Zeitpunkten beprobt. (A) Pchlidgehalt zum Ende der Nacht (EdN). MgP und MgPMME konnten am Ende der Nacht nicht detektiert werden. (B) MgP-, (C) MgPMME-, beziehungsweise (D) Pchlidgehalte nach 2 und 8h Belichtung. Daten sind als Mittelwert  $\pm$  S.D. für  $n=4$  gezeigt. TM= Trockenmasse.

Bevor auf die Unterschiede zwischen den *gun4-2* Komplementationslinien eingegangen wird, soll zunächst der Verlauf der *steady state* Gehalte in *At Col-0* Pflanzen beschrieben werden: zum Ende der Nachtphase (EdN) konnte lediglich Pchlidgehalt als einziges Intermediat innerhalb des Chl-Zweiges der TBS detektiert werden (Abbildung 3.26 A), die die Gehalte von MgP und MgPMME lagen am EdN unterhalb des Detektionslimits. Zu Beginn der Lichtphase war eine deutliche Zunahme von MgP und MgPMME zu beobachten (Abbildung 3.26 B und C). Bedingt durch die lichtabhängige Aktivität der Protochlorophyllid Oxidoreduktase(n), sank der Gehalt von Pchlidgehalt in *Col-0* innerhalb von zwei Stunden Belichtung auf circa 1/15 des Dunkelwertes (Abbildung 3.26 A und D). Im Verlauf des Tages nahmen sowohl die *steady state* Gehalte von MgP und MgPMME als auch die von Pchlidgehalt weiter ab (Abbildung 3.26 B-D).

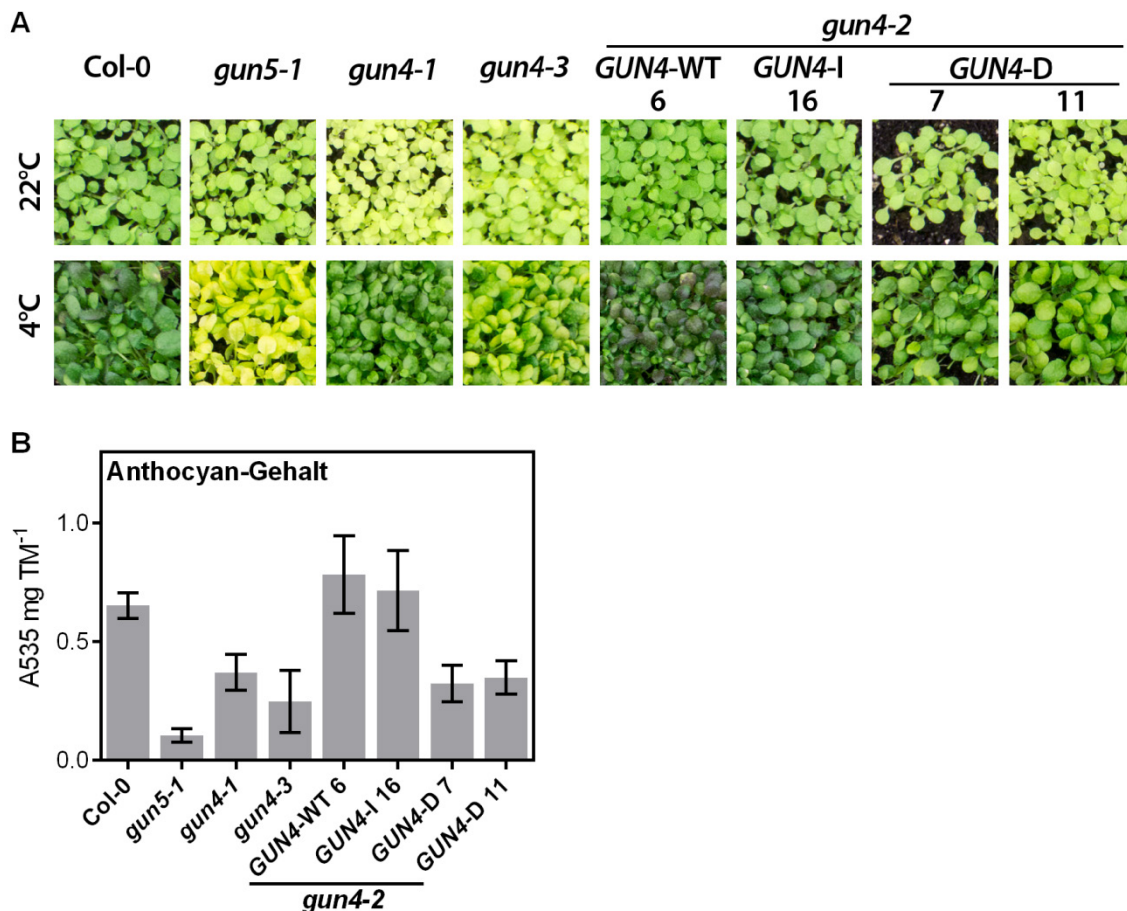
Bereits zum EdN ergaben sich erste Unterschiede zwischen den einzelnen *gun4-2* Komplementationslinien. Im Vergleich zu den *gun4-2/GUN4-I* Linien, die einen in der Tendenz

geringfügig höheren Pchlidgehalt als der WT aufwiesen, akkumulierten die *gun4-2/GUN4-D* Linien nur 70-80% des Gehaltes an Pchlidge der Kontrolllinien (Col-0, bzw. *gun4-2/GUN4-WT*) zum EdN (Abbildung 3.26 A). Wie beim WT zeigte sich auch in den *GUN4-WT* und *GUN4-I* Linien zu Beginn der Lichtphase ein starker Anstieg der *steady state* Level von MgP und MgPMME, die am Ende der Nacht nicht detektierbar waren. Die Pchlidge-Gehalte reduzierten sich in den *gun4-2/GUN4-WT* und *gun4-2/GUN4-I* Linien gleichermaßen (Abbildung 3.26 B-D, 2h Licht). Ein gleiches Verhalten dieser Linien wurde auch nach acht Stunden Belichtung festgestellt (Abbildung 3.26 B-D, 8h Licht). Im Gegensatz zu den Kontrolllinien, war die Zunahme der *steady state* Gehalte von MgP und MgPMME in den *gun4-2/GUN4-D* Linien zu Beginn des Tages stark vermindert. Die *gun4-2* Komplementationslinien, welche das phosphomimikry *GUN4(S264D)* exprimierten, wiesen einen gleichbleibend niedrigen Gehalt (circa 30% des WT-Gehaltes nach zwei Stunden Belichtung) von MgP und MgPMME im Verlauf des Tages auf (Abbildung 3.26 B und C). Zum Ende der Lichtphase sanken die Pchlidge-Gehalte noch unter den Wert der nach zwei Stunden Belichtung gemessen wurde (Abbildung 3.26 D).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Expression des *GUN4(S264D)* im *gun4-2* Hintergrund im Vergleich zu den Kontrolllinien zu verringerten Flüssen innerhalb der TBS führte. Ferner verursacht die Phosphorylierung von *GUN4* einen verminderten *steady state* Gehalt von Intermediaten des Chl-Zweiges im Übergang von der Nacht zum Tag.

### **3.6.3 Der Einfluss von Kältestress auf die Akkumulation von Anthocyanen in *gun4* und *gun5* Mutanten**

Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit zur Kältestressantwort in *Arabidopsis* hat ergeben, dass eine Mutante für die MgCh H Untereinheit (*gun5*) eine Veränderung der Reaktion auf Kälte zeigte (Kindgren et al., 2015). Eine hinreichende Erklärung für die publizierten Veränderungen in der *gun5* Mutante wurde zu diesem Zeitpunkt nicht erbracht. Da die Phosphorylierung von *GUN4* einen direkten Einfluss auf die MgCh-Aktivität hatte, wurde ein Experiment zur Kältestressantwort der *gun4-2* Komplementationslinien durchgeführt.



**Abbildung 3.27: Analyse der Kälteantwort in *gun5-1*, *gun4-1*, *gun4-3* und komplementierte *gun4-2* Mutanten.**

Die Pflanzen wurden für 14 Tage bei 22°C im Kurztag (100  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) angezogen und anschließend für 20 Tage bei 4°C im Kurztag bei 100  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  inkubiert. (A) Phänotyp der Pflanzen vor (22°C) und nach der Kältebehandlung (4°C). (B) Anthocyangehalt nach 20 Tagen Kältestress. Daten sind als Mittelwert  $\pm$  S.D. für  $n=3$  gezeigt. TM= Trockenmasse.

Für dieses Experiment wurden die unterschiedlichen Genotypen zunächst unter Raumtemperatur (22°C) angezogen und anschließend für 20 Tage bei 4°C inkubiert (Abbildung 3.27 A). Bereits die phänotypische Analyse nach dem Kältestress zeigte, dass die *gun5-1*, *gun4-1*, *gun4-3* und die *gun4-2/GUN4-D* Linien deutlich heller als die Kontrolllinien waren (Col-0, *gun4-2/GUN4-WT*, *gun4-2/GUN4-I*). Dabei fiel auf, dass der Grad der vermeintlichen Chlorose von *gun5* und *gun4-3* Mutante im Vergleich zum WT nach Kältestress wesentlich stärker ausgeprägt war, als nach Anzucht bei 22°C (Abbildung 3.27 A). Betrachtet man hingegen die Col-0 Pflanzen oder die *gun4-2/GUN4-WT* und *gun4-2/GUN4-I* Linien, so wurde eine deutliche Lilafärbung der Blätter nach Kältestress sichtbar, die bei den *gun5* und *gun4* Mutanten und *GUN4-D* Linien nicht sichtbar war.

Die Ursache für die Färbung der Blätter im Kältestress war die Akkumulation von Anthocyanen. Im Rahmen der Kältestressantwort akkumulieren Pflanzen diese photoprotektiven Schutzpigmente (Abschnitt 1.9, S.70). Die quantitative Analyse der Anthocyangehalte spiegelte die makroskopisch wahrgenommenen Verhältnisse wider: alle Genotypen, die nach Kältestress mit dem bloßen Auge

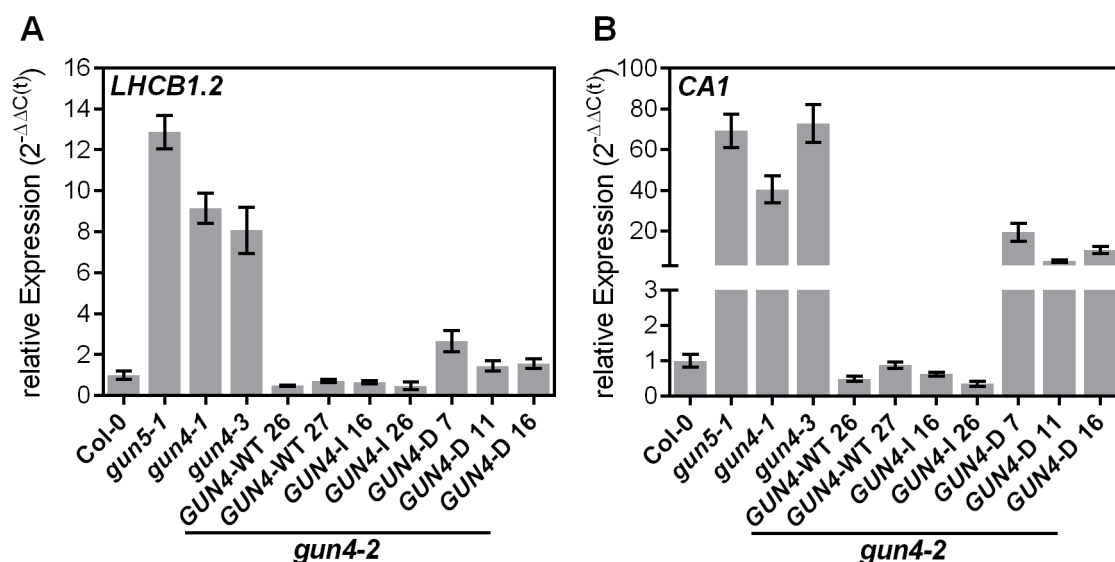
heller erschienen, waren wiesen eine geringere Anreicherung von Anthocyanen auf (Abbildung 3.27 B). Die stärkste Anthocyandefizienz zeigte sich für die *gun5-1* (10-20% WT-Gehalt), gefolgt von den *gun4-1* (60% WT-Gehalt) und *gun4-3* (40-50% WT-Gehalt) Mutanten, sowie den *gun4-2/GUN4-D* Linien (50% WT-Gehalt). Die anderen Komplementationslinien zeigten eine WT-artige Anthocyanakkumulation (Abbildung 3.27 B).

Aus der Analyse der *gun5* und *gun4* Mutanten unter Kältestress ergab sich ein erster Hinweis auf die Notwendigkeit einer funktionellen MgCh für die adäquate Antwort auf diesen abiotischen Stress.

An dieser Stelle sei bereits auf die Analyse von *gun* Mutanten und einen möglichen Zusammenhang zwischen Anthocyanakkumulation und dem von den GUN-Proteinen ausgehenden retrograden Signalweg hingewiesen (siehe Abschnitt 3.12, S.237).

#### **3.6.4 Analyse des retrograden Signalweges in *gun4-2* Komplementationslinien**

Der retrograde Signalweg (RS) beschreibt einen Kommunikationsweg, der es der Pflanzenzelle erlaubt den Zustand der Chloroplasten mit der Expression von Kerngenen, deren Genprodukte in die Plastiden importiert werden müssen, abzustimmen. Mindestens einer dieser Signalwege wird maßgeblich durch die *gun* Mutationen beeinflusst (Abschnitt 1.8, S.57). Dies wurde durch den Vergleich der Expression von *PHOTOSYNTHESIS-ASSOCIATED NUCLEAR GENES* (*PHANGs*) unter beeinträchtigter Chloroplastenentwicklung (zumeist Norflurazon, NF) gezeigt. Um zu überprüfen, inwiefern die Phosphorylierung von GUN4 diesen Signalweg beeinflusst, wurden Pflanzen in Sterilkultur in Anwesenheit von NF angezogen und die Expression zweier Vertreter der *PHANGs* analysiert (Abbildung 3.28).



**Abbildung 3.28:** Analyse des retrograden Signalweges in *gun5-1*, *gun4-1*, *gun4-3* und *gun4-2* Mutanten komplementiert mit genomischen Konstrukten, die für GUN4(WT):GUN4-WT, GUN4(S264I):GUN4-I und GUN4(S264D):GUN4-D kodieren.

Die Pflanzen wurden für 4 Tage im Dauerlicht ( $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in Anwesenheit von  $5 \mu\text{M}$  Norflurazon auf MS-Platten angezogen. Analysiert wurde die Expression von (A) *LIGHT HARVESTING COMPLEX B1.2* und (B) *CARBONIC ANHYDRASE1*. Die Berechnung der Expression erfolgte relativ zur WT-Kontrolle (Col-0) und dem Referenzgen

*ACTIN2*

( $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ ). Daten sind als Mittelwert  $\pm$ SEM für  $n=4$  gezeigt.

Wie erwartet (Susek et al., 1993; Mochizuki et al., 2001; Larkin et al., 2003) zeigten die zuvor beschriebenen *gun5-1* und *gun4-1* Mutanten im Vergleich zum WT (Col-0) eine verstärkte Expression der *PHANGs* für den Lichtsammelkomplex B1.2 (*LHCBI.2*) und Carboanhydrase 1 (*CA1*) nach NF-Behandlung (Abbildung 3.28 A und B). Die zweite allelische *gun4-3* Mutante, die an dieser Stelle erstmalig hinsichtlich des RS analysiert wurde, verhielt sich wie die *gun4-1* Mutante. Sowohl *LHCBI.2*, als auch *CA1* wurden in deutlich stärkerem Maße exprimiert, als im WT. Relativ zum WT wurde *LHCBI.2* in *gun5* und *gun4* um den Faktor 12, bzw. 8 überexprimiert. Das *CA1* Gen hingegen zeigte eine 40-70fach höhere Expression in den bekannten *gun* Mutanten (Abbildung 3.28 A und B). Auffällig war, dass die retrograde Kommunikation in den *GUN4-D* Linien zumindest teilweise wiederhergestellt wurde. Im Vergleich zu den *gun4* und *gun5* Mutanten fiel die Expression der *PHANGs* in diesen Linien weniger stark aus. Dennoch wiesen auch die *gun4-2/GUN4-D* Linien im Vergleich zum WT erhöhte Transkriptgehalte für *LHCBI.2* und *CA1* auf. Relativ zur WT-Kontrolle wurde in den *gun4-2/GUN4-D* Linien für *LHCBI.2* eine 2-4fache und für *CA1* eine 5-20fach höhere Expression im Vergleich zu Col-0 nach NF-Behandlung festgestellt (Abbildung 3.28 A und B). Die Komplementation der *gun4-2* Mutante mit *GUN4-WT* oder *GUN4-I* führte im Sinne der *PHANG*-Expression zu einer WT-artigen Reaktion auf die Störung der Plastidenentwicklung (Abbildung 3.28 A und B).

Somit lässt sich zusammenfassen, dass die Phosphorylierung von GUN4 einen Einfluss auf die retrograde Kommunikation hat. Es wird jedoch vermutet, dass nicht die Phosphorylierung selbst sondern die daraus folgende Beeinträchtigung der MgCh durch GUN4(S264D) verantwortlich für die ausbleibende Repression der *PHANG*-Transkripte ist. Bedingt durch die Ähnlichkeit zu den *gun4* und *gun5* Mutanten wird der *gun* Phänotyp in *gun4-2/GUN4-D* ebenfalls durch die Einschränkung der MgCh hervorgerufen.



### 3.7 Untersuchungen zur Stabilität von GUN4

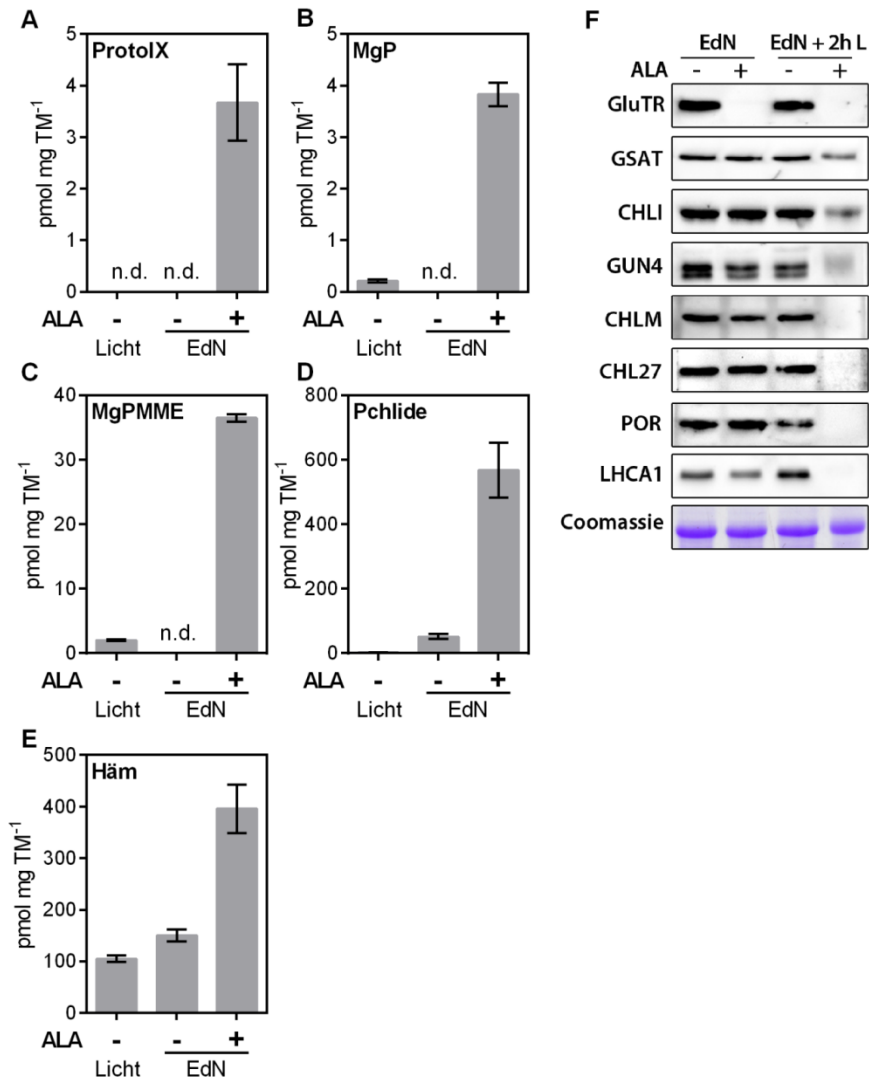
Die Bindung von Porphyrinen wird in der Literatur im Zusammenhang mit der Stabilität des GUN4-Proteins diskutiert. So gibt es Hinweise dafür, dass eine erhöhte Affinität gegenüber ProtoIX und MgP zu einer Destabilisierung von GUN4 führen soll (Larkin et al., 2003; Davison et al., 2005). Für das *Chlamydomonas* GUN4 wurde eine negative Korrelation zwischen ProtoIX-Akkumulation und GUN4-Gehalt gefunden (Brzezowski et al., 2014). Ferner wurde ein Modell beschrieben, in dem GUN4 als „Puffer“ für überschüssige Porphyrinintermediate fungieren und möglicherweise in den Abbau dieser involviert sein soll (Peter und Grimm, 2009).

Um den putativen Zusammenhang zwischen Porphyrin-Akkumulation und GUN4-Stabilität zu analysieren, wurden unterschiedliche Ansätze verfolgt. Zum einen wurden die endogenen Porphyringehalte durch artifizielle Fütterung von jungen *At*-Pflanzen mit ALA oder der Hemmung eines Enzymschrittes der TBS manipuliert. Zusätzlich wurden zwei gentechnische Ansätze gewählt, die Hinweise auf einen möglichen GUN4-Abbau ergeben sollten.

#### 3.7.1 Fütterung von ALA

In einem ersten Ansatz wurden die *steady state* Gehalte von Porphyrinen durch die Fütterung von *At*-Pflanzen mit ALA, der universellen Vorstufe für alle Porphyrine, erhöht. Hierfür wurden *At Col-0* Pflanzen zum Ende des Tages in einen Puffer mit und ohne ALA überführt und über Nacht im Dunkeln inkubiert (Abbildung 3.29).

Im Vergleich zu den vor der Dunkelphase beprobten Pflanzen, führte die Fütterung von ALA zu einer deutlichen Akkumulation von Porphyrinintermediaten. Im Zuge des Überangebotes von Vorstufen, akkumulierten ProtoIX (nicht detektierbar im Licht), MgP (Faktor 10), MgPMME (Faktor 10) und Pchlide (Faktor 200) im Vergleich zu den im Licht gehaltenen Pflanzen (Abbildung 3.29 A-D). Nach der Dunkelphase konnte in den nicht gefütterten Pflanzen lediglich Pchlide (Faktor 20 mehr im Vergleich zum Lichtwert) detektiert werden (Abbildung 3.29 A-D). Die Fütterung von ALA führte ebenfalls zu einer Steigerung des Häm-Gehaltes (Faktor 2 im Vergleich zu Proben ohne ALA). Somit wurde durch die ALA-Fütterung das Ziel der Porphyrin-Akkumulation erreicht.



**Abbildung 3.29: TBS Intermediat- und Proteingehalte nach ALA-Fütterung von *Arabidopsis* Pflanzen.**

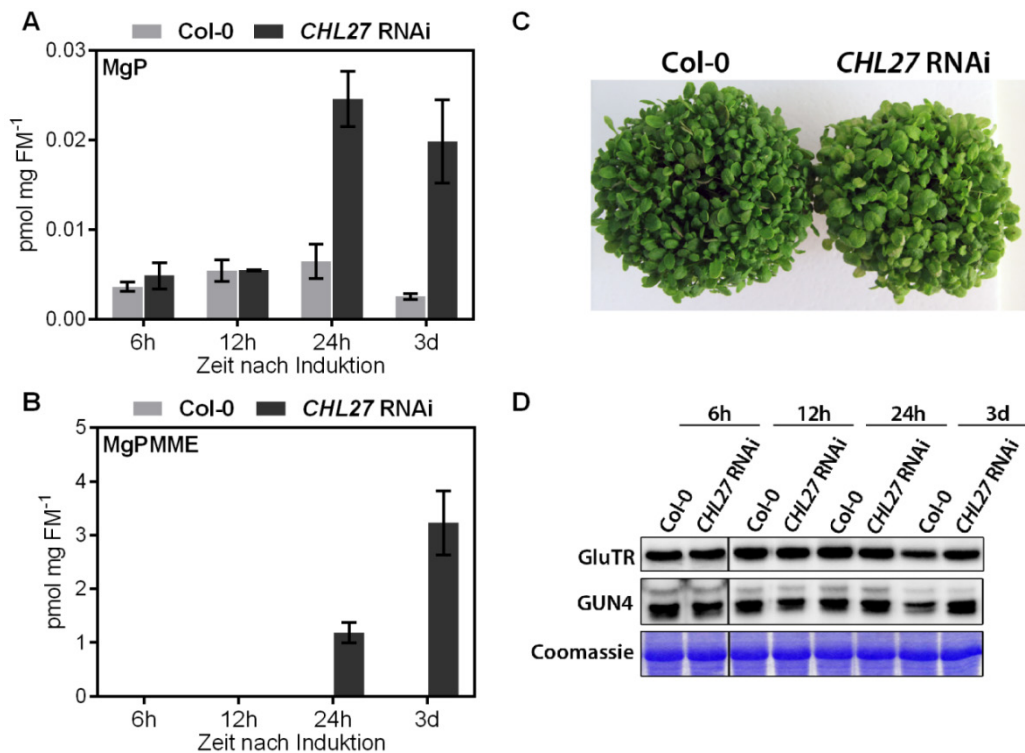
14-Tage alte *Arabidopsis* Col-0 Pflanzen wurden in Puffer mit (+) und ohne (-) 5-Aminolävulinsäure (ALA) inkubiert und anschließend analysiert. (A-E) Analyse der Stoffwechselintermediate ProtoIX (A), MgP (B), MgPMME (C), Pchlide (D) und Häm (E) am Ende der Nacht (EdN/ 14h Dunkelheit). Als Kontrolle ist ein Wert für Col-0 Pflanzen vor der Dunkelinkubation im Puffer gezeigt (-ALA / Licht). (F) Western-Blot-Analyse der ALA-gefütterten Col-0 Pflanzen. Zusätzlich zur Probe am Ende der Nacht (EdN) wurden die Pflanzen für 2 weitere Stunden (EdN + 2h L) im Puffer mit (+) und ohne (-) ALA belichtet. Der Gehalt der GluTR sank im Zuge der ALA-fütterung über Nacht unter das Detektionslimit. TM= Trockenmasse, n.d.= nicht detektierbar. Daten sind als Mittelwert  $\pm$  S.D. für n=4 gezeigt.

Die Western-Blot-Analyse mit den Pflanzen, welche mit und ohne ALA inkubiert wurden, ergab, dass die Gehalte der meisten TBS Enzyme im Zuge der ALA-Fütterung zum Ende der Nacht (EdN) nicht verändert waren (Abbildung 3.29 B). Unabhängig vom Angebot der Vorstufen lag insbesondere das GUN4-Protein in gleichen Mengen in der Dunkelheit vor. Im Gegensatz zu GUN4 wurde hingegen eine Abnahme der GluTR nach ALA-Fütterung zum EdN beobachtet (Abbildung 3.29 B). Wurden die zum EdN analysierten Pflanzen anschließend für zwei Stunden im Licht inkubiert, zeigte sich eine deutliche Abnahme aller analysierten Proteine (Abbildung 3.29 B). Diese Abnahme war mit der phototoxischen Wirkung der akkumulierten Porphyrine und den somit vorliegenden Stress durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu erklären.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Stabilität des GUN4 unter erhöhten *steady state* Gehalten von Porphyrinen in der Dunkelheit nicht beeinflusst wurde. Porphyrine, wie ProtoIX, MgP, MgPMME und Pchlido, nahmen keinen Einfluss auf die Stabilität des GUN4 in der Dunkelheit. Ferner deutete der durch die Akkumulation von Porphyrinen induzierte und spezifische Abbau der GluTR auf einen neuen Regulationsmechanismus der GluTR-Stabilität hin. Dieser wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter analysiert. Weitergehende Analysen zu diesem Themenkomplex ließen jedoch den Schluss zu, dass die GluTR in der Konsequenz akkumulierender TBS-Intermediate durch die plastidäre Clp-Protease abgebaut wurde (A. Richter, J. Schmied, B. Grimm, Daten nicht veröffentlicht und Aritz et al. (2016)).

### 3.7.2 Untersuchung der GUN4-Stabilität in einer induzierbaren *CHL27* RNAi Linie

Wenngleich die artifizielle Erhöhung der Porphyringehalte keinen Einfluss auf die Stabilität des GUN4 hatte, wurde ein gentechnischer Ansatz zur Steigerung der endogenen Porphyringehalte genutzt. Hierfür wurde eine Mutantenlinie für die katalytische Untereinheit der oxidativen Cyclase (Tottey et al., 2003), welche MgPMME zu Pchlido umsetzt, eingesetzt (Schlicke et al., 2014). Die durch Dexamethason induzierte Expression eines *CHL27* RNAi Konstruktes führte zu einem *knockdown* der *CHL27* Expression, welche bereits innerhalb weniger Stunden zu einer Akkumulation von MgP und MgPMME, dem Substrat der Cyclase führte (Abbildung 3.30 A und B, Schlicke et al. (2014)). Die langfristige Expression des *CHL27* RNAi Konstruktes hatte die Ausprägung eines chloritischen Phänotyps im Dauerlicht zur Folge (Abbildung 3.30 C).



**Abbildung 3.30: Untersuchung des Einflusses von Intermediaten des Tetrapyrrolstoffwechsels auf die Stabilität von GUN4 in einer *CHL27* RNAi Linie.**

Zur endogenen Anreicherung von Porphyrinintermediaten wurde eine induzierbare *CHL27* RNAi Linie mit Dexamethason induziert und im Vergleich mit dem Col-0 WT analysiert. Die Pflanzen wurden im Dauerlicht gehalten. (A) MgP und (B) MgPMME 6, 12, 24h und 3d nach Induktion des RNAi-Konstruktes in der *CHL27* RNAi-Linie. Im WT wurden nur Spuren an MgPMME zu allen Zeitpunkten gemessen. (C) Phänotyp von Col-0 und *CHL27* RNAi Pflanzen 3d nach Induktion. (D) Western-Blot-Analyse der GluTR und GUN4 Gehalte in Col-0 und *CHL27* RNAi Linie 6, 12, 24h und 3d nach Induktion des RNAi-Konstruktes. Die Akkumulation von MgP und MgPMME in der *CHL27* RNAi-Linie hatte keinen Einfluss auf die Stabilität des GUN4. FM= Frischmasse. Daten sind als Mittelwert ±S.D. für n=3 gezeigt.

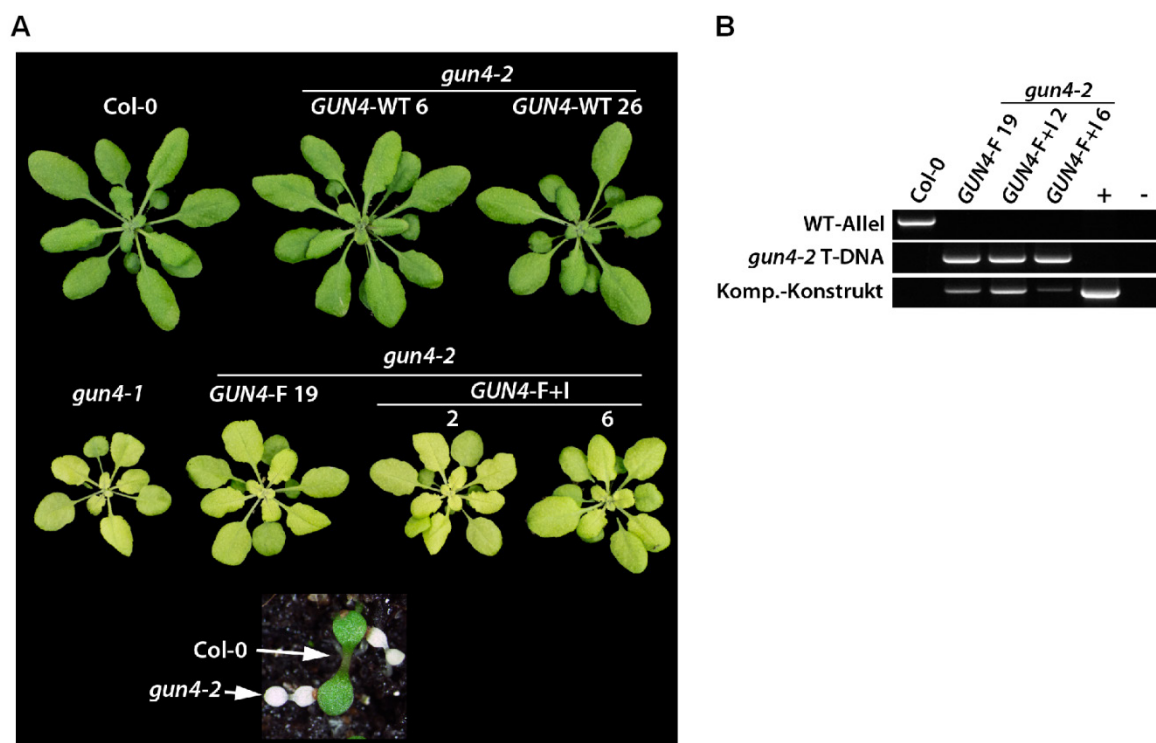
Im Laufe einer kinetischen Analyse nach 6, 12, 24h und 3 Tagen zeigten sich keine Unterschiede im GUN4-Gehalt zwischen WT-Pflanzen und der induzierten *CHL27* RNAi Linie (Abbildung 3.30 D). Trotz deutlicher Akkumulation von MgP und MgPMME (Abbildung 3.30 A und B) wiesen die *CHL27* RNAi Pflanzen einen WT-artigen GUN4-Gehalt auf (Abbildung 3.30 D). Somit hatte die endogene Akkumulation von Mg-Porphyrinen im Licht keinen destabilisierenden Einfluss auf GUN4.

### 3.7.3 Zusammenhang zwischen GUN4-Stabilität und Phosphorylierung

Hinweise auf einen möglichen Abbau von GUN4 im Zuge der Bindung von Mg-Porphyrinen ergaben sich aus der Analyse der *gun4-1 knockdown* Mutante durch Larkin et al. (2003). Es wurde festgestellt, dass die durch EMS ausgelöste Mutation des Basentriplets für ein Leucin an Position 88 des GUN4 zu einem Phenylalanin (L88F) in der *gun4-1* Mutante die Destabilisierung und folglich einen *knockdown* des GUN4 bewirkte (Larkin et al., 2003). Weitergehende Analysen zeigten, dass das homologe GUN4-1 aus *Synechocystis* und *Thermosynechococcus* eine größere Affinität gegenüber ProtoIX und MgP als das WT-Protein aufwiesen (Davison et al., 2005). Beide Befunde kombiniert, veranlassten die

Autoren zu vermuten, dass die erhöhte Affinität gegenüber Porphyrinen zu einem verstärkten Abbau des GUN4-1 Proteins in *gun4-1* führte.

Um zu überprüfen, ob die durch die L88F Mutation bedingte Instabilität des GUN4 durch seine Phosphorylierung positiv oder negativ beeinflusst wird, wurde die *gun4-2* Mutante mit einer doppelt mutierten Version des GUN4 transformiert. Das erzeugte *GUN4-F+I* Konstrukt kodierte für ein GUN4(L88F+S264I) mit der GUN4-1 (L88F) Mutation als auch den *knockout* der Phosphorylierungsstelle (S264I). Zusätzlich wurde der *gun4 knockout* mit einem *GUN4-F* Konstrukt transformiert. Die selektierten homozygoten Linien (Abbildung 3.31 A und B) exprimierten das GUN4(L88F) Protein und waren in Bezug auf *GUN4* allelisch zur *gun4-1* Mutante.

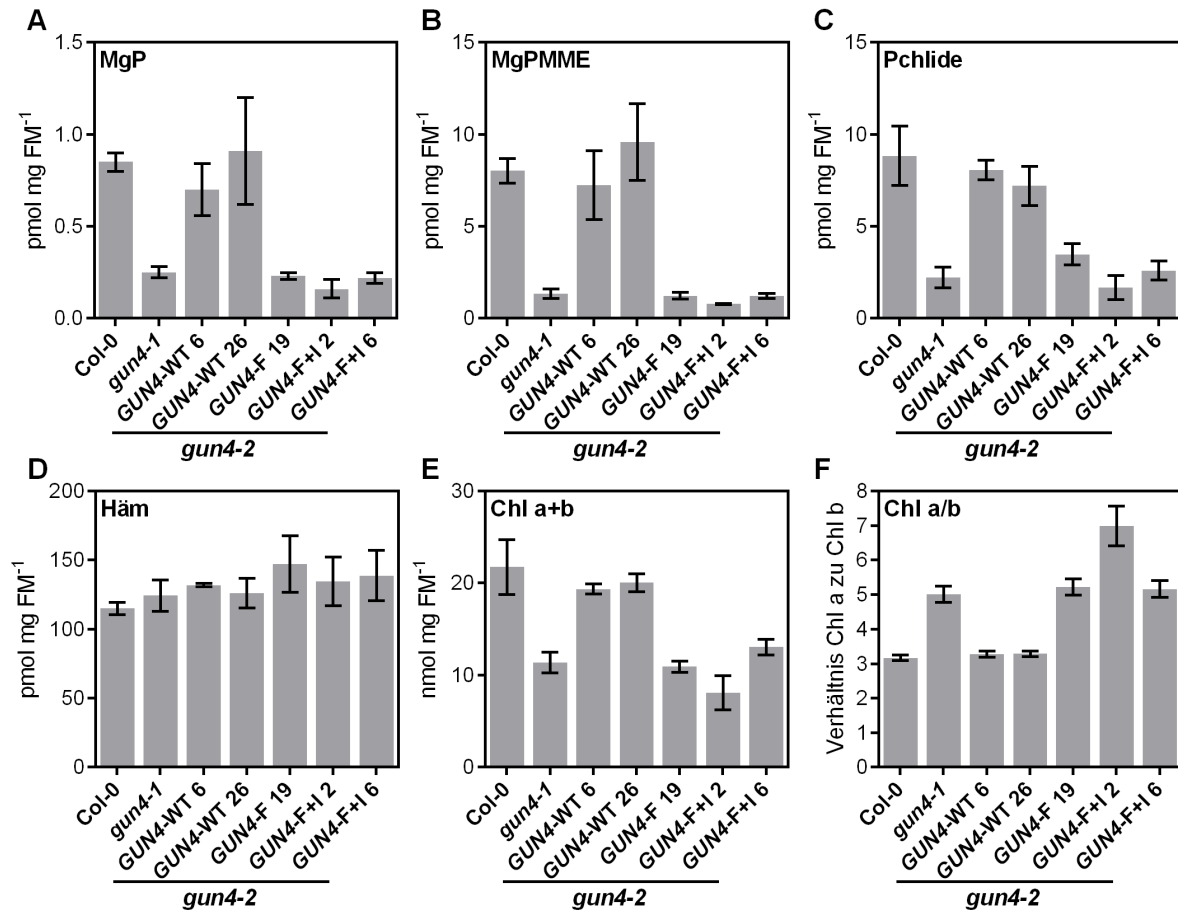


**Abbildung 3.31: Komplementation einer *gun4-2* knockout Mutante mit genomischen Konstrukten, die für GUN4(WT):GUN4-WT, GUN4(L88F):GUN4-F und GUN4(L88F+S264I):GUN4-F+I kodierten.**

(A) Phänotypen der analysierten Genotypen nach Anzucht für 4 Wochen im Kurztag bei  $120 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Als Kontrolle ist der Col-0 WT und eine *gun4-1* Mutante gezeigt, welche ein punktmutiertes (L88F) GUN4 exprimierte. Ebenfalls ist die homozygote *gun4-2* Mutante 5 Tage nach Keimung im Kurztag bei  $120 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  gezeigt (weiße Pflanzen, unten). (B) Genotypisierung der *GUN4-F* und *GUN4-F+I* Linien. Gezeigt sind die PCR-Amplifikate für das WT-Allel, die *gun4-2* T-DNA (Hintergrund der Komplementationslinien), sowie das eingebrachte Komplementationskonstrukt (Komp.-Konstrukt). Als Positivkontrolle (+) wurde das pCambia3301\_GUN4(WT) Plasmid, als Negativkontrolle (-) Wasser eingesetzt. Das Ausbleiben der Phosphorylierung des GUN4(L88F) Proteins führte zu einem Chl-armen Phänotyp, wie er bei der *gun4-1* Mutante beobachtet wurde.

Wie zuvor beschrieben (Vergleich Abschnitt 3.3.2, S.145), zeigte die *gun4-1* Mutante unter Standardwachstumsbedingungen einen Chl-defizienten Phänotyp, welcher in seiner Intensität mit dem der *gun4-2*/GUN4-F Linie vergleichbar war (Abbildung 3.31 A). Im Vergleich zum WT (Col-0) und den zuvor eingeführten *gun4-2*/GUN4-WT Linien (Vergleich Abschnitt 3.2, S.133) führte auch die

Expression von GUN4(L88F+S264I) im homozygoten *gun4-2* Hintergrund (*gun4-2/GUN4-F+I* Linien) zu einer verminderten Akkumulation von Chl (Abbildung 3.31 A).

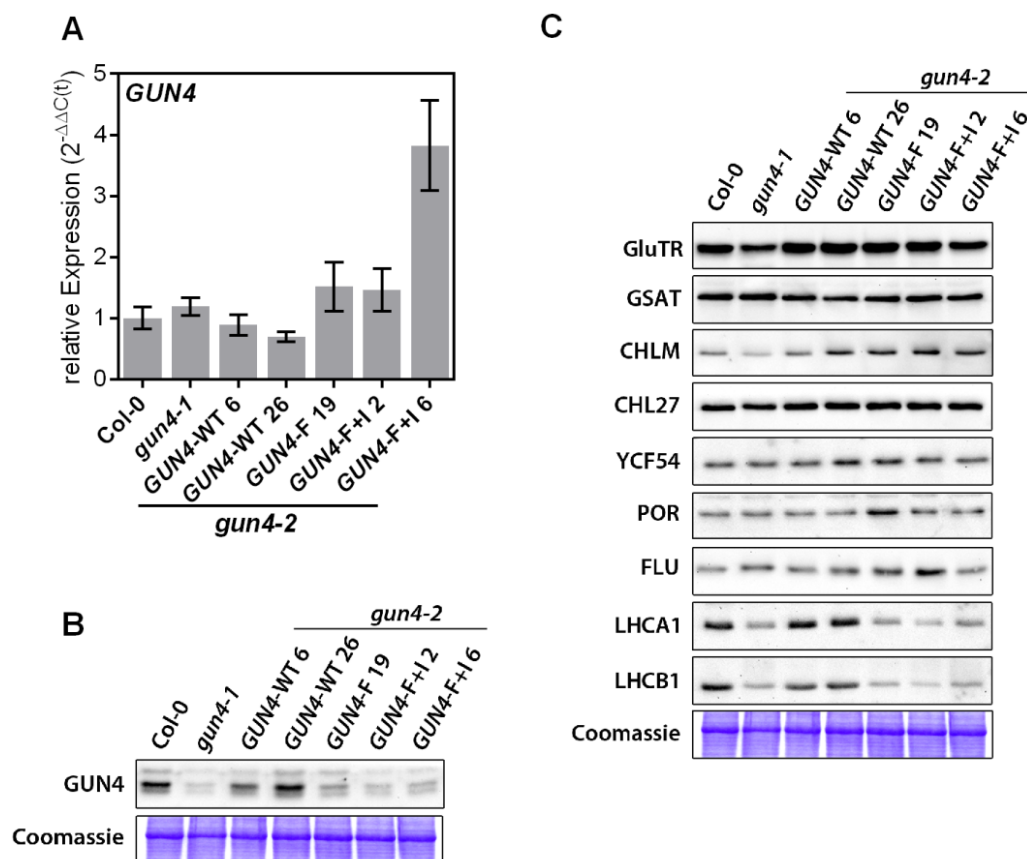


**Abbildung 3.32: Analyse der Intermediate und Endprodukte der Tetrapyrrolbiosynthese in den Komplementationslinien einer *gun4-2* knockout Mutante (GUN4(WT):GUN4-WT, GUN4(L88F):GUN4-F, GUN4(L88F+S264I):GUN4-F+I).**

Die Pflanzen wurden für 14 Tage im Kurztag bei 100  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  angezogen. Die Ernte erfolgte 2h nach Belichtungsbeginn. Als Kontrolle sind die Werte des Col-0 WT und eine *gun4-1* Mutante gezeigt, welche ein punktmutiertes (L88F) GUN4 exprimierte. (A) MgP, (B) MgPMME, (C) Pchlido, (D) Häm, (E) Gehalt von Chlorophyll (Chl) a und b, (F) Chl a zu b-Verhältnis. FM= Frischmasse. Daten sind gezeigt als Mittelwert  $\pm$  S.D., n=3. Die hier gezeigten Ergebnisse wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von C. Hochheuser erzeugt.

Der im Vergleich zu den Kontrolllinien deutlich chlorotische Phänotyp war auf die verminderten Gehalte von MgP, MgPMME und Pchlido (unter 30% WT-Gehalt, Abbildung 3.32 A-C) und die daraus folgenden reduzierten Chl-Gehalte (50% WT-Gehalt, Abbildung 3.32 E und F) zurückzuführen. Im Vergleich zu den *gun4-2/GUN4-WT* Linien wurden nur marginale Unterschiede in den Gehalten der Intermediate und Endprodukte des Chl-Zweiges zwischen der *gun4-1* und den *gun4-2/GUN4-F* und *gun4-2/GUN4-F+I* Linien festgestellt.

Die isolierten *gun4-2/GUN4-F* und *gun4-2/GUN4-F+I* Linien zeigten eine mindestens WT-artige GUN4 Expression. Im Vergleich zur *gun4-2/GUN4-F 19* und *gun4-2/GUN4-F+I 2* Linie, war die *gun4-2/GUN4-F+I 6* Linie ein leichter Überexpresser des Transgens (Abbildung 3.33 A).



**Abbildung 3.33: Untersuchung des Einflusses der Phosphorylierung auf die Stabilität des GUN4.**

(A) Quantifizierung der *GUN4*-Expression in Col-0, *gun4-1* und den *gun4-2* Komplementationslinien (*GUN4*-WT, *GUN4*-F, *GUN4*-F+I) angezogen für 14 Tage im Kurztag bei  $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Die Ernte erfolgte 2h nach Belichtungsbeginn. Die Berechnung der Expression erfolgte relativ zur WT-Kontrolle (Col-0) und den Referenzgenen *SAND* und *PEX4* ( $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ ). Daten sind als Mittelwert  $\pm$ SEM für  $n=3$  gezeigt. (B) Western-Blot-Analyse des GUN4-Gehaltes in den analysierten Genotypen. (C) Western-Blot-Analyse von Proteinen der Tetrapyrrolbiosynthese. Zusätzlich wurden die LHCA1/B1-Proteine analysiert. Die hier gezeigten Ergebnisse wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von C. Hochheuser erzeugt.

Im Gegensatz zur Expression des *GUN4*-WT Konstruktes hatte die Expression von *GUN4*-F im *gun4-2* Hintergrund einen verminderten GUN4-Gehalt zur Folge. Der GUN4-Gehalt der *GUN4*-F Linie war vergleichbar mit dem der *gun4-1* Mutante (Abbildung 3.33 B). Trotz WT-artiger Expression des Transgens, zeigten die *gun4-2/GUN4*-F+I Linien und *GUN4*-F Linie einen verminderten GUN4-Gehalt im Vergleich zu Col-0 und der *GUN4*-WT Linie. Im Vergleich zur *gun4-1* und *gun4-2/GUN4*-F Linie führte der zusätzliche *knockout* der Phosphorylierungsstelle nicht zu einer zusätzlichen Destabilisierung oder umgekehrt zu einer Stabilisierung des GUN4(L88F+S264I) Proteins (Abbildung 3.33 B). Weitere Gehalte der an der TBS beteiligten oder assoziierten Proteine lagen in WT-artigen oder zur *gun4-1* Mutante vergleichbaren Mengen in den *gun4-2/GUN4*-F und *gun4-2/GUN4*-F+I Linien vor (Abbildung 3.33 C).

Wenngleich die publizierte Hypothese zur Destabilisierung des GUN4 in der *gun4-1* Mutante durch erhöhte Affinitäten des GUN4 gegenüber Porphyrinen erklärbar ist, so zeigte sich, dass die Phosphorylierung keinen Einfluss auf diesen mutmaßlichen Abbaumechanismus hatte. Die

gleichzeitige Mutation von L88F und S264I führte weder zu einer zusätzlichen Destabilisierung noch zu einer Stabilisierung des GUN4(L88F) (GUN4-1) Proteins.

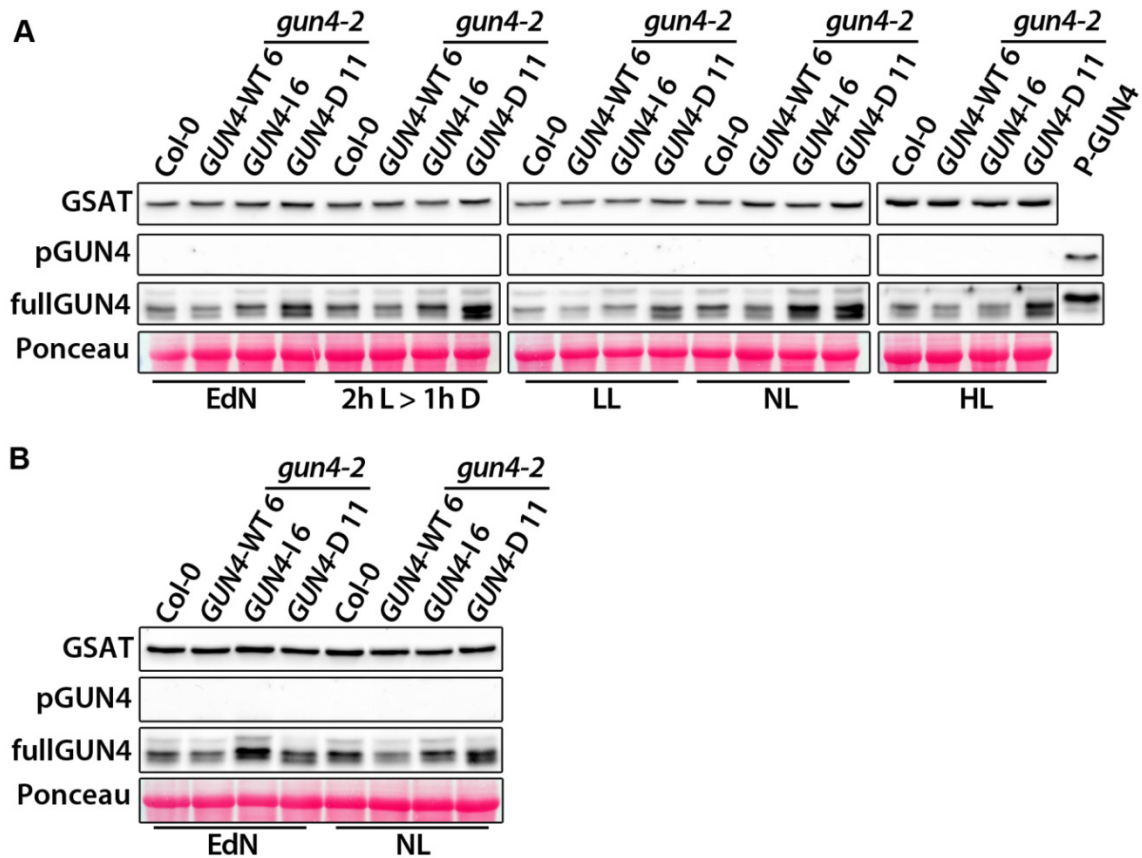


### **3.8 Versuch der Detektion von phosphoryliertem GUN4 in Pflanzenextrakten**

Die Analysen zur *in vitro* Phosphorylierung (Abschnitt 3.1, S.119) und dem *in vitro* und *in vivo* Einfluss der Phosphomimikry-Variante von GUN4 auf die MgCh deuteten auf eine Veränderung der GUN4-Funktion durch Phosphorylierung. Diese Befunde sollten durch Untersuchungen von Pflanzenextrakten aus unterschiedlichen Anzuchtsbedingungen untermauert werden. Dabei sollte der phosphorylierungsspezifische pGUN4-Antikörper auf diese Extrakte angewendet werden. Es sollte geklärt werden, wie groß der Anteil von phosphoryliertem Protein am Gesamtgehalt von GUN4 ist.

#### **3.8.1 Extraktion von Pflanzenproteinen in Anwesenheit von Phosphataseinhibitoren**

Aus der Kommunikation mit anderen Arbeitsgruppen war bekannt, dass die Detektion von phosphorylierten Proteinen aus Pflanzenextrakten mittels phosphorylierungsspezifischen Antikörpern gewissen Limitationen unterlegen ist (M. Wirtz, Universität Heidelberg und P. Gialalisco, MPI Golm, persönliche Kommunikation). Die Konservierung des Phosphorylierungszustandes eines Proteins bei der Vorbereitung der Proteinextrakte wird durch hohe Aktivitäten von (unspezifischen) Phosphatasen (PPase) erschwert. Daher wurde die Gewinnung der Pflanzenextrakte für die unten gezeigte Analyse in Anwesenheit von zwei unterschiedlichen PPase-Inhibitoren entsprechend den Angaben der Hersteller isoliert.



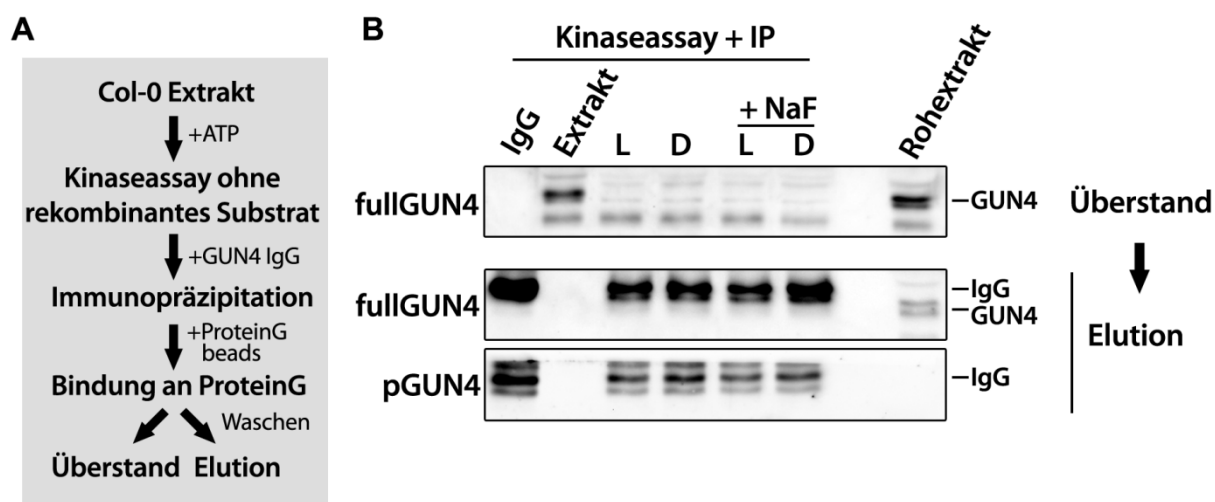
**Abbildung 3.34: Western-Blot-Analyse von Proteinextrakten die in Anwesenheit von Phosphataseinhibitoren isoliert wurden.**

(A) „HALT PPase inhibitor mix“ (3% v/v; Thermo Scientific) und (B) „PPase inhibitor Cocktail II“ (2% v/v; Sigma). Untersucht wurde die *in vivo* GUN4-Phosphorylierung in Col-0 und *gun4-2* Komplementationslinien angezogen für 14 Tage in verschiedenen Lichtbedingungen (Kurztag). Die Pflanzen wurden im Schwachlicht (LL, 20  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), Normallicht (NL, 120  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und Hochlicht (HL, 300  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) und 2h nach Belichtungsbeginn geerntet. Zusätzlich wurden Proben zum Ende der Nacht (EdN) und von Pflanzen, die nach 2 h Belichtung (im NL) für eine weitere Stunde in der Dunkelheit inkubiert wurden. Als Kontrolle für den pGUN4-Antikörper wurden 50 ng GUN4, welches zuvor in einem Kinaseassay phosphoryliert wurde, aufgetragen (P-GUN4; letzte Spur in A).

Zur Analyse des *in vivo* Phosphorylierungszustandes von GUN4 wurden unterschiedliche *At* Genotypen zum Ende der Nacht, nach kurzzeitiger Dunkelinkubation oder angezogen im Schwachlicht, Normallicht und Hochlicht analysiert (Abbildung 3.34). Unter Einsatz der verwendeten PPase-Inhibitor (siehe Legende Abbildung 3.34) wurde unter keinen der hier analysierten Bedingungen ein Immunsignal für den pGUN4 Antikörper in der Größe des GUN4 detektiert, wenngleich das GUN4-Protein mit dem fullGUN4 Antikörper nachgewiesen wurde (Abbildung 3.34 A und B).

### 3.8.2 Versuch der Anreicherung von endogenem GUN4 nach einem Kinaseassay

Da vermutet wurde, dass der endogene Gehalt an phosphoryliertem GUN4 zu gering bzw. der verwendete pGUN4 Antikörper einen zu geringen Titer besaß, wurde folgender experimenteller Ansatz verfolgt (Abbildung 3.35 A). Zunächst wurde ein Gesamtextrakt von *At Col-0* Pflanzen, die im Licht angezogen wurden, erstellt. Dieser wurde in Anwesenheit von ATP im Licht oder Dunkelheit inkubiert. Mit dem Ziel der Anreicherung von GUN4 wurde anschließend eine Immunopräzipitation (IP) mit dem aufgereinigten fullGUN4 Antikörper (gerichtet gegen das *full length* GUN4) durchgeführt. Nach einem Waschschriff und der sauren Elution des Antigen-Antikörper-Komplexes von der verwendeten ProteinG-Matrix (bindet die konstanten Ketten von IgGs) wurden die Eluate auf die Anwesenheit von phosphoryliertem GUN4 mittels Western-Blot analysiert (Abbildung 3.35 A).



**Abbildung 3.35: Versuch des Nachweises von phosphoryliertem GUN4 durch Anreicherung mittels Immunopräzipitation (IP) aus Col-0 Extrakten nach einem Kinaseassay.**

(A) Schema zur Durchführung des Experimentes. Weitere Erläuterungen im Text. (B) Western-Blot-Analyse des Überstandes und der Elutionsfraktionen der IP. Es wurde ein Kinaseassay ohne Zugabe von rekombinantem GUN4 in Licht (L) und Dunkel (D) durchgeführt. Ein Teil der Reaktionen wurde nach dem Kinaseassay (vor der IP) mit dem Phosphataseinhibitor Natriumfluorid (+NaF) versetzt. Die IP erfolgte mit einem aufgereinigten fullGUN4 Antikörper, welcher an die magnetische Matrix (gekoppelt mit ProteinG) gebunden wurde. Als Kontrolle wurden der Antikörper allein (IgG) und der Extrakt (ohne Zugabe von IgGs) nach dem Kinaseassay im Licht und anschließender IP-Prozedur aufgetragen. Die Proben „IgG“ und „Extrakt“ wurden wie die anderen Proben behandelt. In der letzten Spur ist ein Aliquot des Rohextraktes ohne Kinaseassay und IP aufgetragen.

Das Ergebnis der an einen Kinaseassay gekoppelten IP ist in Abbildung 3.35 B dargestellt. Das erste Western-Blot-Ergebnis zeigt den GUN4 Gehalt im Überstand nach der IP (Inkubation mit GUN4 Antikörper und Bindung an die ProteinG-Matrix). Die als Rohextrakt bezeichnete Probe wurde direkt nach Erstellung des Pflanzenextraktes mit Ladepuffer versetzt. Im Vergleich zum Aliquot des Rohextraktes, zeigt die Spur des „Extraktes“ ohne Inkubation mit den GUN4 IgGs einen vergleichbaren GUN4-Gehalt (Abbildung 3.35 B). Das GUN4 wurde also während der circa dreistündigen Prozedur nicht abgebaut. Im Gegensatz zur „Extrakt“-Probe konnte in den Proben,

welche nach dem Kinaseassay mit dem GUN4 Antikörper inkubiert wurden, kein GUN4 mehr detektiert werden (Abbildung 3.35 B, „L“ und „D“). Dieser Befund deutete auf eine erfolgreiche Bindung von GUN4 an die IgGs und somit auf eine Abreicherung des GUN4 aus den Extrakten hin.

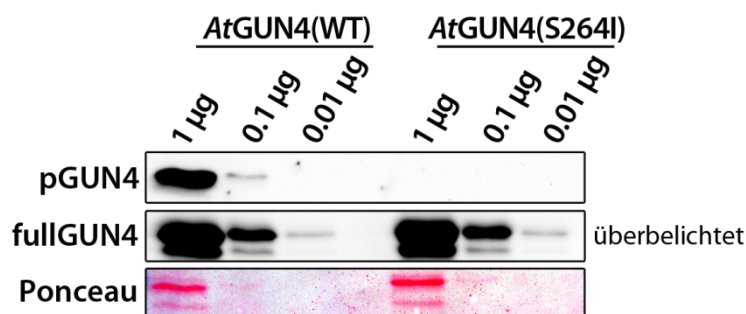
Nach der Elution der GUN4-IgG-Komplexe konnten Signale sowohl für den fullGUN4 als auch pGUN4 Antikörper detektiert werden (Abbildung 3.35 B). Jedoch wurden diese Signale nicht nur in den Proben des Kinaseassay („L“ und „D“), sondern auch in der Spur der IgGs detektiert (Abbildung 3.35 B, „IgG“). Alle detektierten Banden hatten dieselbe Größe wie die Banden die in der „IgG“-Spur beobachtet wurden. Die aufgenommenen Signale entsprachen daher der Bindung des sekundären Antikörpers (IgG aus Ziege gerichtet gegen Kaninchen IgG) an den zur IP eingesetzten und eluierten GUN4 Antikörper (erzeugt in Kaninchen). Da diese (unspezifischen) Banden in derselben Größe wie das GUN4-Protein im SDS-Gel migrierten, war eine Zuordnung, bzw. Detektion von GUN4 in den Eluaten nicht möglich.

Grundsätzlich war dieser Ansatz geeignet GUN4 aus einem Col-0 Extrakt abzureichern. Allerdings war der Grad der Anreicherung in den Eluaten nicht ausreichend um das GUN4 - vor dem Hintergrund der IgGs - zu detektieren.

### **3.8.3 Analyse der Detektionsgrenze des pGUN4 Antikörpers**

Die zuvor gezeigten Versuche, das phosphorylierte GUN4 in Pflanzenextrakten nachzuweisen, waren nicht erfolgreich. Denkbar war, dass der Anteil an phosphoryliertem GUN4 in einer bestimmten Bedingung nicht 100% war (z.B. Dunkelheit). Als weitere mögliche Ursache wurde eine zu geringe Sensitivität, bzw. ein zu geringer Antikörper-Titer angenommen. Daher wurde eine Analyse der Detektionsgrenze des pGUN4 Antikörpers für rekombinantes, phosphoryliertes GUN4 durchgeführt.

Hierfür wurde rekombinantes AtGUN4(WT) und AtGUN4(S264I) im Rahmen eines Kinaseassay in der Dunkelheit phosphoryliert und anschließend eine Verdünnungsreihe von 1 µg zu 10 ng GUN4 per Western-Blot analysiert (Abbildung 3.36).



**Abbildung 3.36: Western-Blot-Analyse der Detektionsgrenze von rekombinantem und phosphoryliertem *Arabidopsis* (At)GUN4 mit dem phosphorylierungsspezifischen pGUN4 Antikörper.**

Aufgetragen wurden unterschiedliche Mengen von rekombinantem AtGUN4(WT) und AtGUN4(S264I) welche zuvor in einem Kinaseassay eingesetzt wurden. Um die Signale des fullGUN4 Antikörpers für die stärkste Verdünnung sichtbar zu machen, wurde der Kontrast verstärkt. Der pGUN4 wurde 1:500, der fullGUN4 Antikörper 1:2500 eingesetzt. Die mit dem pGUN4 inkubierte Membran wurde für 20 min, die des fullGUN4 Antikörpers für 1 s exponiert.

Beide GUN4-Varianten (WT und S264I) ergaben in den entsprechenden Verdünnungsstufen dieselben Signalintensitäten für den fullGUN4 Antikörper (Abbildung 3.36, fullGUN4). Die Signalstärken nahmen mit abnehmender Menge von GUN4-Protein ab. Erwartungsgemäß wurde das AtGUN4(S264I) Protein nicht phosphoryliert und daher nicht durch den pGUN4 Antikörper erkannt (Abbildung 3.36, pGUN4). Wenngleich der Anteil von phosphoryliertem GUN4 unbekannt war, wurde das WT-Protein bei einer Menge von 1 µg sehr gut, unterhalb dieser Menge jedoch nur mäßig durch den pGUN4 Antikörper detektiert. Wenngleich die Ursache für diesen Befund unklar blieb, zeigte sich, dass der fullGUN4, im Vergleich zum pGUN4 Antikörper, wesentlich geringere Mengen von GUN4 nachweisen konnte (Abbildung 3.36, pGUN4). So wurden 10 ng GUN4 noch durch den fullGUN4, nicht aber durch den pGUN4 detektiert. Ein quantitativer Vergleich der Detektionsgrenzen zwischen pGUN4 und fullGUN4 Antikörper war nur schwerlich zu ermitteln. Daher musste es bei der semi-quantitativen Feststellung bleiben, dass der verwendete pGUN4 Antikörper trotz 5-fach geringerer Verdünnung während der über Nacht Inkubation mit der Membran und wesentlich längerer Expositionszeit wenigstens um den Faktor 10 insensitiver war als der fullGUN4 Antikörper.

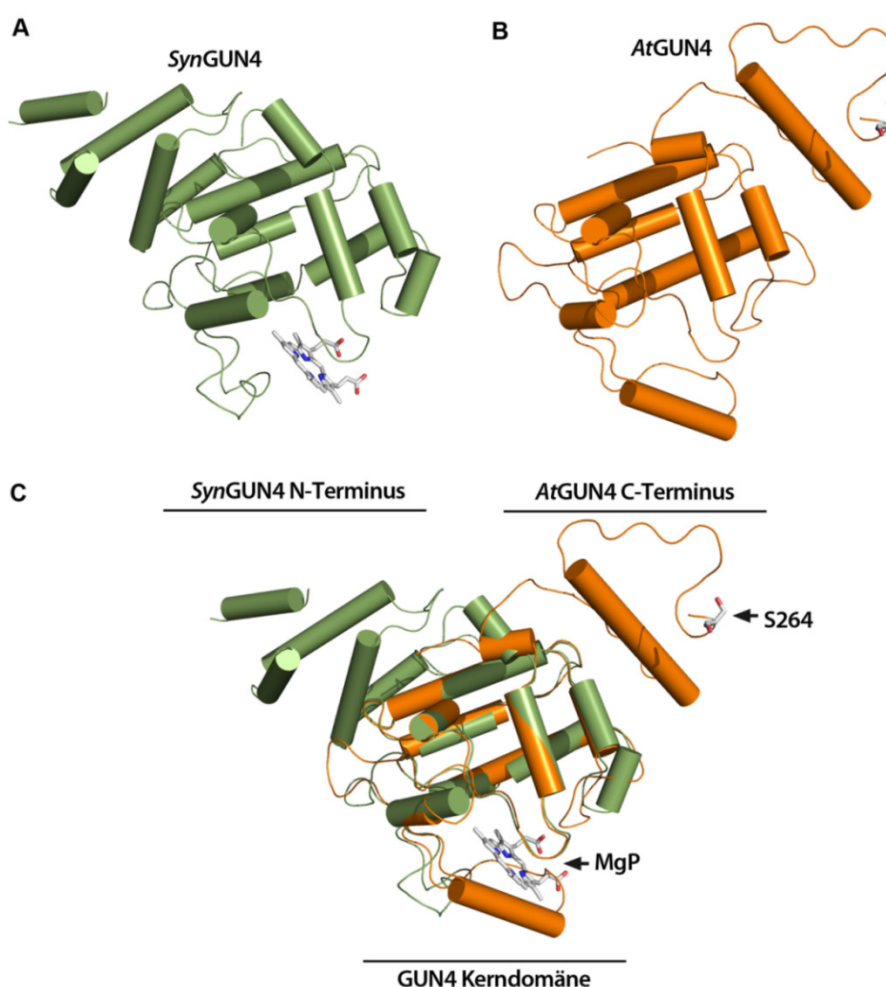
Im Falle der Analyse des *in vivo* Phosphorylierungszustandes von GUN4 kam dieser Befund besonders zum Tragen: mit einer unabhängigen Untersuchung wurde festgestellt, dass in 15 µg Gesamtpflanzenextrakt von *At Col-0* circa 10- 50 ng GUN4 enthalten waren (Daten nicht gezeigt). Diese und sogar geringere Mengen konnten ohne Einschränkungen im Rahmen eines Western-Blots im Standardverfahren mit dem fullGUN4 Antikörper detektiert werden. Mit der Annahme, dass die Detektionsgrenze des pGUN4 im Vergleich zum fullGUN4 Antikörper 10fach höher war, hätten wenigstens 100-500 ng ausschließlich phosphoryliertes GUN4 vorliegen müssen, um dieses in einem Pflanzenextrakt nachweisen zu können.



### 3.9 Einfluss des GUN4 C-Terminus auf die Stimulation der MgCh in

#### Angiospermen

Bereits im Jahr 2003 wurde ein Sequenzvergleich zwischen *Synechocystis* (*Syn*)GUN4 und (*At*)*Arabidopsis* GUN4 veröffentlicht (Larkin et al., 2003). Dieser legte nahe, dass das *Syn* und *At*GUN4 eine gemeinsame, hochkonservierte Kerndomäne teilen (Abbildung 3.37), welche für die Bindung von Porphyrinen notwendig ist (Davison et al., 2005; Verdecia et al., 2005; Chen et al., 2015c). Zusätzlich zu dieser Domäne, besitzt das *Syn*GUN4 eine N-Terminale und das *At*GUN4 eine C-terminale Erweiterung. Diese C-terminale Erweiterung ist flexibel und wird nicht von anderen strukturellen Elementen des *At*GUN4-Proteins koordiniert (Abbildung 3.37).



**Abbildung 3.37: Vergleich der Tertiärstruktur von (A) *Synechocystis* (*Syn*) und (B) *Arabidopsis* (*At*)GUN4.**

Die Kristallstruktur des *Syn*GUN4 wurde experimentell ermittelt (Datenbankeintrag 4XKC / Chen et al. (2015c)). Die Struktur des *At*GUN4 wurde mit dem Phyre<sup>2</sup>-Algorithmus vorhergesagt. Das MgP im *Syn*GUN4 und die Phosphorylierungsstelle (S264) des *At*GUN4 sind hervorgehoben. (C) Überlagerung der Strukturen (A) und (B). Beide Strukturen teilen eine gemeinsame Kerndomäne. *Syn*GUN4 zeigt eine N-terminale, *At*GUN4 eine C-terminale Erweiterung.

Der C-Terminus von *At*GUN4 beherbergt die Phosphorylierungsstelle (vorletzte Aminosäure (AS)). Da das cyanobaterielle GUN4-Homolog einen im Vergleich zum *At*GUN4 verkürzten C-Terminus ohne

Phosphorylierungsstelle aufweist, wurden Untersuchungen zum Einfluss des C-Terminus auf die Funktion von AtGUN4 angestrebt.

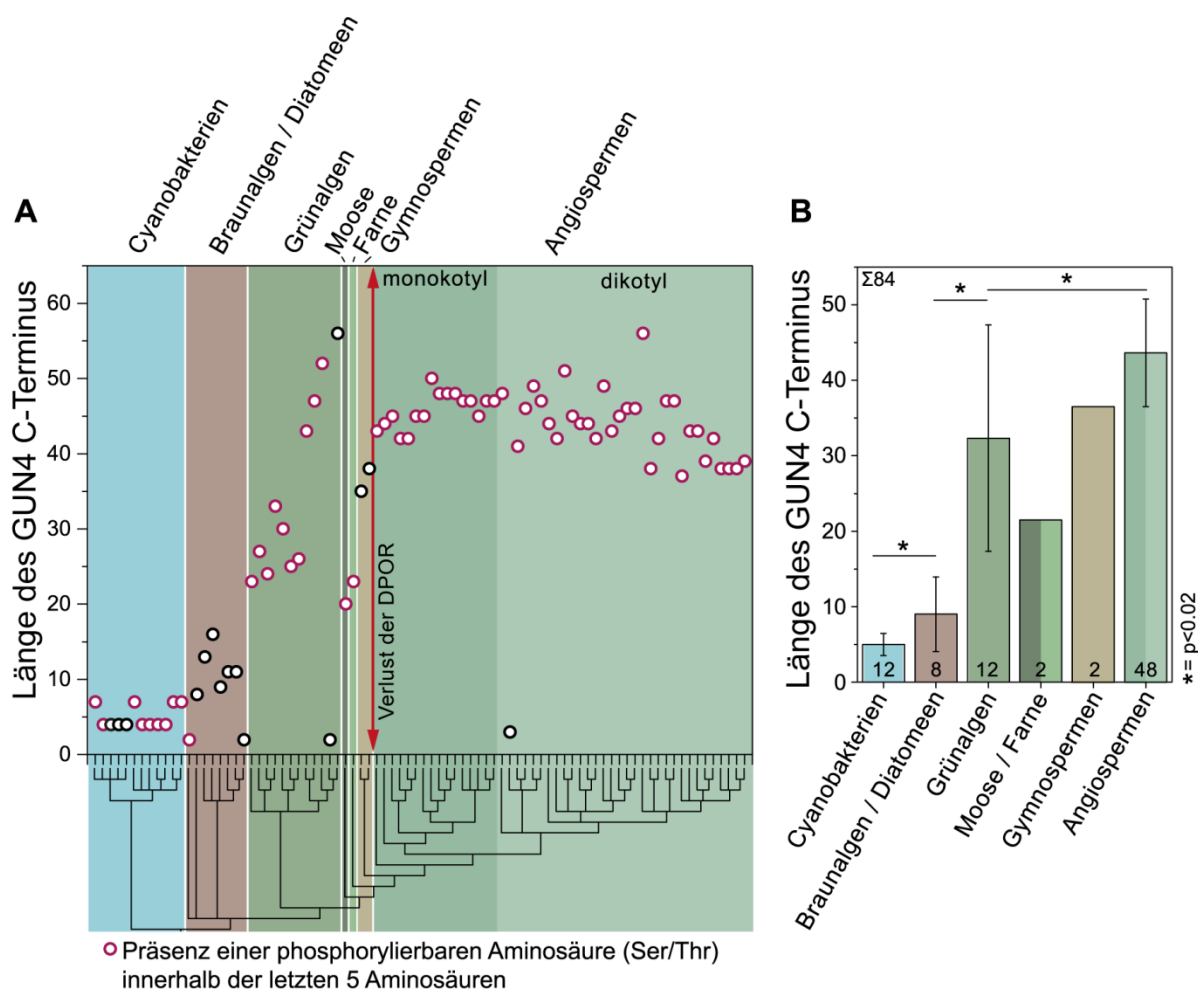
### **3.9.1 Evolution der Phosphorylierungsstelle innerhalb einer C-terminalen Erweiterung in GUN4-Homologen von Angiospermen**

Zunächst sollte analysiert werden, ob der im Vergleich zum *SynGUN4* verlängerte C-Terminus spezifisch für das AtGUN4-Protein war oder ob sich dieser möglicherweise im Laufe der Evolution in einzelnen phylogenetischen Gruppen herausbildete.

Für diese Fragestellung wurde eine BLAST-Analyse mit einem hochkonservierten Peptid der GUN4-Kerndomäne durchgeführt (siehe Material und Methoden). Anschließend wurde die Länge des C-Terminus dieser GUN4-Homologe (84 Sequenzen) bestimmt. Hierfür wurde ein eigens entwickelter (Phyton-)Algorithmus verwendet, der die Anzahl der AS nach der letzten Helix der GUN4-Kerndomäne ermittelt (In Zusammenarbeit mit Dr. C. Fufezan, Westfälische Wilhelms-Universität Münster). Die Kerndomäne endet mit einem konservierten Histidin-Prolin (HP)- Motiv, welches als Startpunkt der Zählung diente (Vergleich Abbildung 3.39). Das Ergebnis der Zählung ist in Abbildung 3.38 dargestellt.

Die aus der *in silico* Analyse erhaltenen C-terminalen Längen (CTL) der GUN4-Homologe wurden gegen einen phylogenetischen Stammbaum der entsprechenden Organismen aufgetragen (Abbildung 3.38 A). Aus diesem Ergebnis war eine eindeutige Korrelation der CTL und Evolution der (oxygenen) photosynthetisch aktiven Organismen zu erkennen. Die GUN4-Proteine der phylogenetisch ältesten Organismen (Cyanobakterien) wiesen den kürzesten C-Terminus auf. Mit fortschreitender Evolution nahmen die CTL der GUN4-Homologe kontinuierlich zu, bis in der Gruppe der Angiospermen das Maximum der CTL erreicht wurde (Abbildung 3.38 A). Auffällig war ebenfalls, dass das Vorhandensein einer phosphorylierbaren AS (Serin oder Threonin) innerhalb der letzten 5 AS des C-Terminus lediglich in der Gruppe der Angiospermen konserviert war (Abbildung 3.38 A, farbige Datenpunkte). Eine manuelle Analyse der GUN4-Sequenz von *Genlisea aurea* (Abbildung 3.38 A, schwarzer Datenpunkten innerhalb der Angiospermen) ergab, dass diese Sequenz unvollständig war. Der in der Datenbank hinterlegten Proteinsequenz fehlte der C-Terminus, obwohl er nach *in silico* Translation der cDNA vorhanden war (Daten nicht gezeigt). Da der Rohdatensatz nicht durch manuelle Eingriffe manipuliert werden sollte, findet sich dieser Datenpunkt dennoch im Gesamtergebnis.



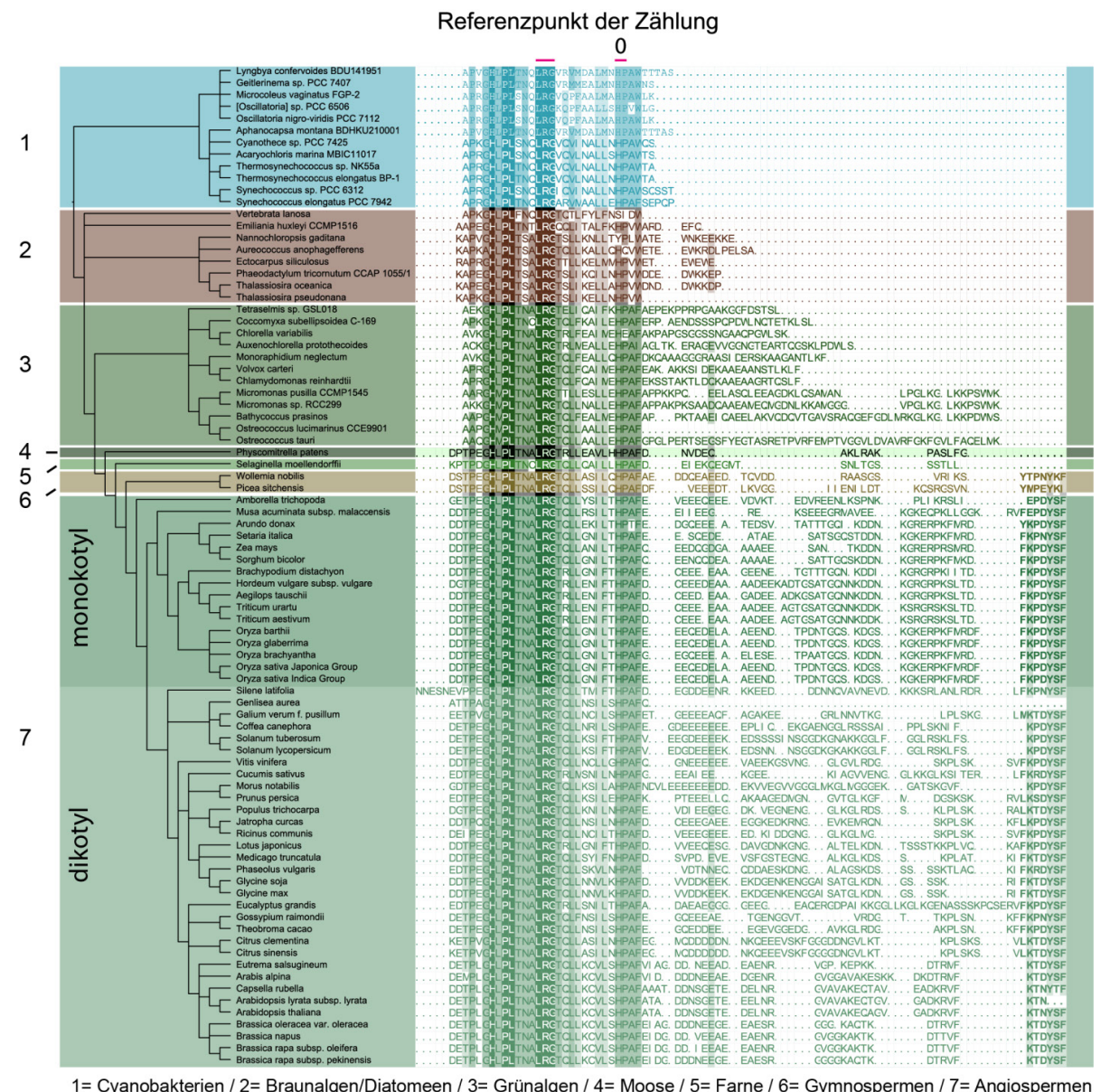


**Abbildung 3.38: Ermittlung der C-terminalen Länge (CTL) von GUN4-Homologen in photosynthetisch aktiven Organismen.**

(A) Auftragung der CTL gegen einen phylogenetischen Stammbaum photosynthetisch aktiver Organismen (evolutionärer Verlauf). Die Namen der Spezies können der Abbildung 3.39 entnommen werden. Jeder Punkt entspricht einem GUN4-Protein aus einem Organismus. Farbige Punkte kennzeichnen die Präsenz einer phosphorylierbaren Aminosäure (Serin oder Threonin) innerhalb der letzten 5 Aminosäuren des entsprechenden C-Terminus. Der Ausreißer innerhalb der Angiospermen entspricht einem partiellen GUN4-Fragment von *Genlisea aurea* (Gattung: Reusenfalle), welches in der Datenbank hinterlegt war, jedoch nicht aus dem Ergebnis des BLASTp (siehe Abschnitt 2.10.1, S.116) entfernt wurde. (B) Statistische Auswertung der evolutionären Verlängerung des GUN4 C-Terminus. Die CTL sind als Mittelwert  $\pm$  S.D. angegeben. \* = statistisch signifikant ( $p > 0,02$ , student'scher t-Test). Der Phyton-Algorithmus zur *in silico* Ermittlung der CTL wurde anhand von Vorgaben des Autors dieser Arbeit durch Dr. C. Fufezan (Westfälische Wilhelms-Universität Münster) erstellt. Diese Abbildung wurde in Richter et al. (2016b) veröffentlicht.

Eine quantitative Auswertung der ermittelten CTL zeigte eine signifikante Verlängerung des GUN4 C-Terminus zwischen zwei phylogenetischen Gruppen (Abbildung 3.38 B). So kodierten die phylogenetisch ältesten Cyanobakterien für ein GUN4 mit einer gemittelten CTL von  $5 \pm 1,5$  AS. Die CTL nahm in der Gruppe der Diatomeen und Braunalgen signifikant zu ( $9 \pm 5$  AS). Während in der Gruppe der Grünalgen eine CTL von  $32 \pm 15$  AS vorlag, zeigte sich eine signifikante Verlängerung des GUN4 C-Terminus der Angiospermen auf  $47 \pm 7$  AS (Abbildung 3.38 B). Wenngleich für die Moose/Farne und Gymnospermen keine statistischen Aussagen getroffen werden konnten (jeweils

nur zwei Sequenzen vorhanden), zeigten auch diese Landpflanzen eine Zunahme der CTL im Vergleich zu den Cyanobakterien.



**Abbildung 3.39: Alignment der GUN4 C-Termini der in Abbildung 3.38 analysierten Organismen.**

Der Referenzpunkt („HP“ in Relation zum „LRG“- Motiv) für die algorithmusgestützte Zählung der C-terminalen Länge der GUN4-Homologe ist hervorgehoben („0“). Die farbigen Striche markieren die konservierten „LRG“ und „HP“-Motive. Die phylogenetischen Gruppen sind wie folgt kodiert: 1= Cyanobakterien / 2= Braunalgen/Diatomeen / 3= Grünalgen / 4= Moose / 5= Farne / 6= Gymnospermen / 7= Angiospermen. Die GUN4-Homologe der Angiospermen weisen eine konservierte C-terminale Konsensussequenz auf (K P/T D/N Y S F). Diese Abbildung wurde in Richter et al. (2016b) veröffentlicht.

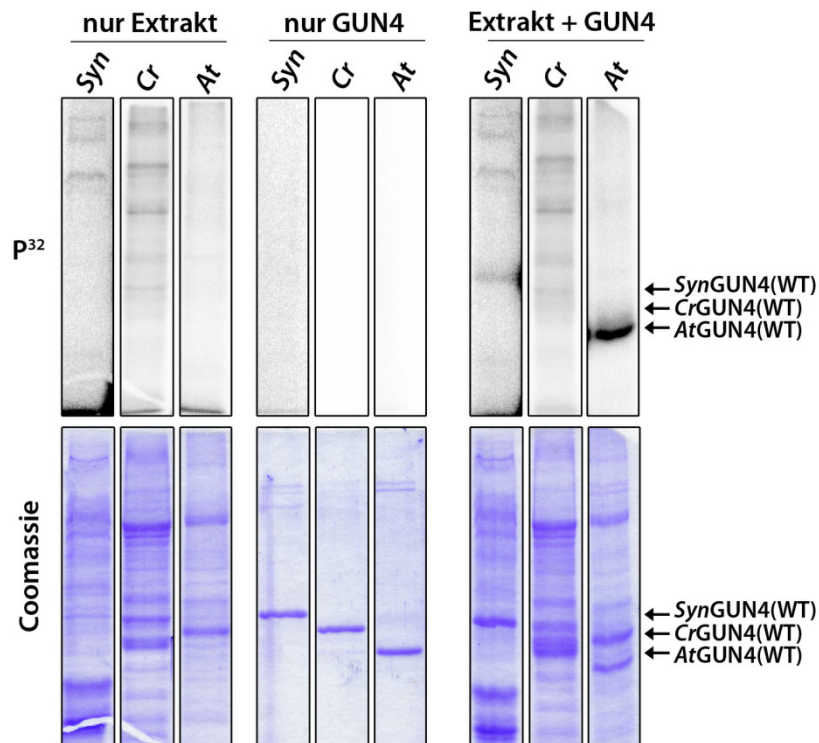
Das in Abbildung 3.39 gezeigte Alignment der analysierten C-Termini bestätigte die zuvor ermittelten Verhältnisse. Ferner zeigte sich, dass die GUN4-Proteine der Angiospermen einen hochkonservierten C-Terminus aufwiesen. Das in *At* phosphorylierte Serin (pS) fand sich in dieser Gruppe in einem FKP/TD/NYpSF Motiv (Abbildung 3.39). Interessanterweise besaßen die zwei Vertreter der

Gymnospermen einen zum AtGUN4 ähnlichen, wenngleich deutlich verkürzten, C-Terminus. Das C-terminale Motif der Gymnospermen zeigte bereits Ähnlichkeiten zum konservierten Motiv des GUN4 aus den Angiospermen - es fehlte jedoch die Phosphorylierungsstelle: **YT/MPN/EYKF/I**.

Wie zuvor festgestellt, entwickelte sich die Phosphorylierungsstelle und C-terminale Erweiterung des GUN4 in der Gruppe der Angiospermen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von GUN4 eine verminderte Stimulationsfähigkeit der MgCh zur Folge hatte. Da die GUN4-Homologe der Cyanobakterien und Grünalgen die MgCh ebenfalls stimulieren können, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Regulation der MgCh-Aktivität durch die Phosphorylierung des GUN4 (C-Terminus) auf die Gruppe der Angiospermen begrenzt ist. Eminentester Bestandteil dieser Hypothese ist die Annahme, dass sich die Verlängerung des C-Terminus als Voraussetzung zur Regulation der MgCh-Aktivität durch die Phosphorylierung von GUN4 in den Angiospermen entwickelt hat.

### 3.9.2 Untersuchungen zur Phosphorylierbarkeit von *Synechocystis*, *Chlamydomonas* und *Arabidopsis* GUN4

Um zu untersuchen ob die Möglichkeit zur Phosphorylierung des GUN4 auf die Angiospermen begrenzt ist, wurde zunächst ein radioaktiver Kinaseassay mit den rekombinanten GUN4-Homologen aus *Synechocystis*, *Chlamydomonas* und *Arabidopsis* in Kombination mit den jeweiligen Extrakten dieser Spezies durchgeführt (Abbildung 3.40).



**Abbildung 3.40: GUN4-Kinaseassay mit Extrakten von *Synechocystis* (Syn), *Chlamydomonas* (Cr) und *Arabidopsis* (At).**

Als Substrat wurden die jeweiligen GUN4(WT)-Homologe eingesetzt. Gleiche Mengen an Protein der Extrakte („nur Extrakt“) wurden mit den rekombinanten GUN4-Proteinen („nur GUN4“) in Anwesenheit von radioaktiv markiertem ATP inkubiert und ein Aliquot des Kinaseassays („Extrakt + GUN4“) mittel SDS-PAGE analysiert. Das Phosphorylierungssignal (P<sup>32</sup>) (oberes Panel) wurde mit dem Phosphoimager ausgelesen. Die Coomassie gefärbten Gele (unteres Panel) zeigen die Extrakte und aufgereinigten GUN4-Proteine. Die Spuren wurden für eine übersichtlichere Darstellung neu angeordnet. Die Kontrastverhältnisse zwischen den Kontrollen und den Signalen des Kinaseassays wurden dabei nicht verändert. Nur das AtGUN4(WT) wurde durch den At-Extrakt phosphoryliert. Die hier gezeigten Ergebnisse wurden durch den Autor dieser Arbeit erzeugt und im Rahmen der Bachelorarbeit von C. Hochheuser veröffentlicht. Diese Abbildung wurde in Richter et al. (2016b) veröffentlicht.

In den Assayansätzen, die nur die Extrakte enthielten, konnten deutliche Phosphorylierungssignale detektiert werden (Abbildung 3.40, „nur Extrakt“). Dies war ein Indiz für aktive Proteinkinasen, die Phosphatreste auf die in den Extrakten enthaltenen (endogenen) Proteine übertragen haben. Im Gegensatz zu den Ansätzen mit Syn und CrGUN4 und Extrakt, konnte für den Kinaseassay mit AtGUN4 und At Extrakt eine GUN4-Phosphorylierung nachgewiesen werden (Abbildung 3.40,

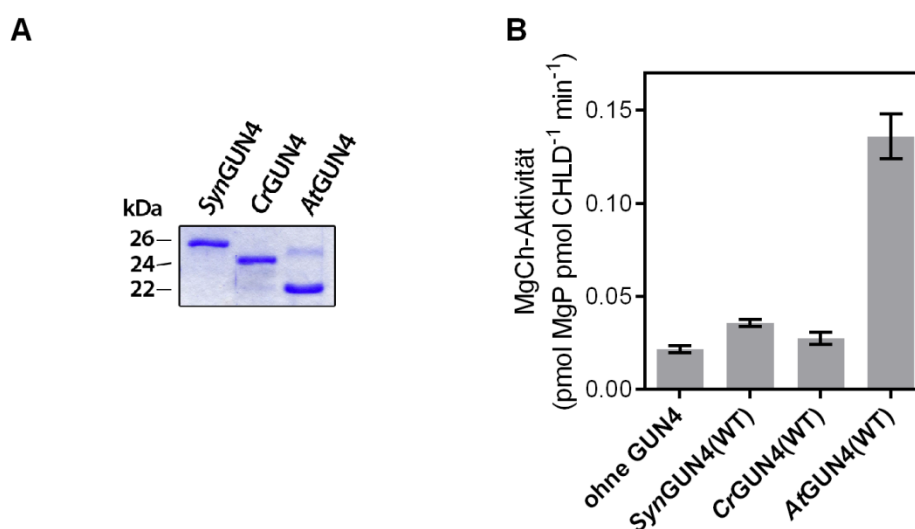
„Extrakt+GUN4“). Die alleinige Inkubation der *Syn*, *Cr* und *AtGUN4*-Proteine mit radioaktiv markiertem ATP ergab keine Phosphorylierungssignale (Abbildung 3.40, „nur GUN4“).

Somit wurde festgestellt, dass nur das *AtGUN4* durch eine Kinase im *At* Extrakt unter den hier gewählten Assaybedingungen phosphoryliert wurde. Die GUN4-Homologe von *Syn* und *Cr* wurden nicht phosphoryliert. Damit bestätigte sich die Annahme, dass die GUN4-Phosphorylierung (im C-Terminus) auf die Gruppe der Angiospermen beschränkt war.

### 3.9.3 In vitro MgCh-Assay mit *Synechocystis*, *Chlamydomonas* und *Arabidopsis* GUN4

Die zuvor aufgestellte Hypothese besagt, dass die Entwicklung des (verlängerten) C-Terminus in Angiospermen eine Voraussetzung für die Regulation der MgCh-Aktivität durch GUN4 ist. Diese Vermutung implizierte, dass der GUN4 C-Terminus einen Einfluss auf die Stimulation der MgCh in Angiospermen hat.

Da die *Syn* und *CrGUN4*-Homologe durch einen im Vergleich zum *AtGUN4* verkürzten C-Terminus charakterisiert waren, wurde die Stimulationsfähigkeit der rekombinanten MgCh aus Reis (Vertreter der Angiospermen) durch die *Syn* und *CrGUN4* Homologe untersucht (Abbildung 3.41).



**Abbildung 3.41: In vitro MgCh-Assay mit *Synechocystis* (*Syn*), *Chlamydomonas* (*Cr*) und *Arabidopsis* (*At*)GUN4-Proteinen.**

(A) Analyse der rekombinanten GUN4-Proteine exprimiert in *E.coli* und aufgereinigt per HIS-tag. Gezeigt ist ein Coomassie gefärbtes Gel. (B) MgCh-Assay mit *Syn*, *Cr*, *AtGUN4*(WT). Die beiden heterologen *Syn* und *CrGUN4* stimulierten die *OsMgCh* nicht. Die hier gezeigten Ergebnisse wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von C. Hochheuser erzeugt. Diese Abbildung wurde in Richter et al. (2016b) veröffentlicht.

Wie zuvor beobachtet, stimulierte das *AtGUN4*(WT) Protein die Reis MgCh um den Faktor 3-4 im Vergleich zu einem MgCh-Assay ohne GUN4. Interessanterweise konnten die *Syn* und *CrGUN4*



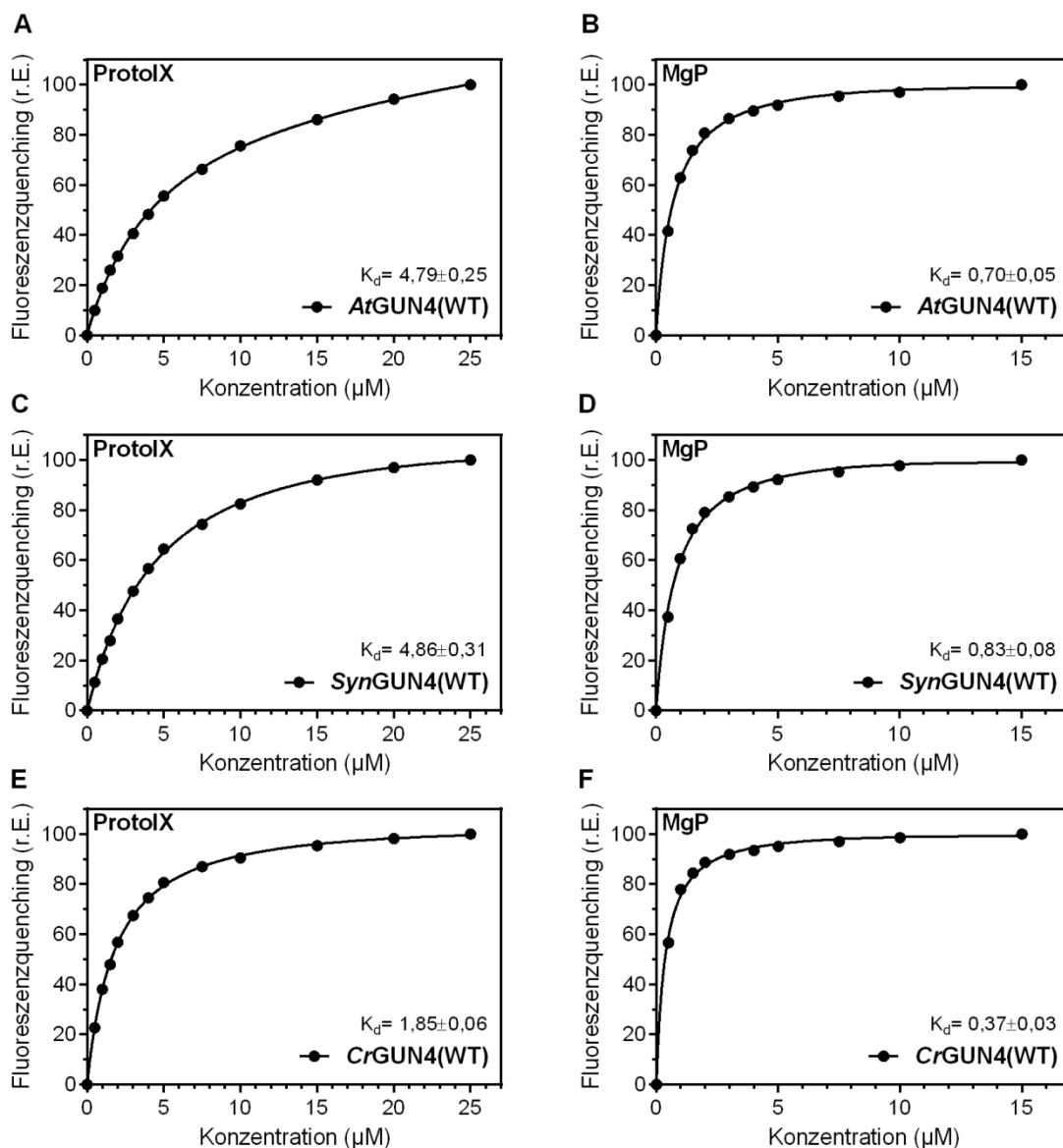
Homologe die Aktivität der MgCh aus Reis nicht, bzw. nur in einem sehr begrenzten Umfang, stimulieren (Abbildung 3.41 B).

Um auszuschließen, dass die fehlende Stimulation der Reis MgCh durch die *Syn* und *CrGUN4* Homologe durch eine nicht native Struktur bedingt wurde, kam erneut die Methode der Porphyrinbindungsstudie zum Einsatz. Diese sollte Aufschluss über eine möglicherweise durch die Expression und Aufreinigung der rekombinanten Proteine bedingte Veränderung in der GUN4-Tertiärstruktur geben (Abbildung 3.42).

Im Vergleich zum *AtGUN4*-Protein zeigten die *Syn* und *CrGUN4* Homologe sowohl eine Bindung von ProtoIX (Abbildung 3.42 A, C, E) als auch von MgP (Abbildung 3.42 B, D, F).

Für ProtoIX wurde für *SynGUN4*(WT) ein  $K_d = 4,86 \pm 0,31 \mu\text{M}$ , für *CrGUN4*(WT) ein  $K_d = 1,85 \pm 0,06 \mu\text{M}$  und für das *AtGUN4*(WT) ein  $K_d = 4,79 \pm 0,25 \mu\text{M}$  ermittelt. Auch die *Syn* und *CrGUN4* Homologe bindeten MgP mit in etwa 10-fach höherer Affinität (10-fach geringerer  $K_d$ ). Daher wurde für die Bindung von MgP an das *SynGUN4*(WT) ein  $K_d = 0,83 \pm 0,08 \mu\text{M}$ , für *CrGUN4*(WT) ein  $K_d = 0,37 \pm 0,03 \mu\text{M}$  und für das *AtGUN4*(WT) ein  $K_d = 0,70 \pm 0,05 \mu\text{M}$  bestimmt. Die ermittelten Affinitätswerte gegenüber den Porphyrinen lagen im Bereich der zuvor detektierten (siehe Abschnitt 3.4, S.151), bzw. publizierten  $K_d$ -Werte für das *SynGUN4* (ProtoIX: 0,86- 2,29  $\mu\text{M}$  / MgP: 0,3- 0,44  $\mu\text{M}$ ) und *AtGUN4* (ProtoIX: 2,66-11  $\mu\text{M}$  / MgP: 0,3-1,6  $\mu\text{M}$ ) (Davison et al., 2005; Verdecia et al., 2005; Adhikari et al., 2009).

Mit den zwischen allen GUN4-Homologen vergleichbaren Bindungskonstanten für ProtoIX und MgP konnte eine nicht native Faltung oder eine veränderte Tertiärstruktur der *Syn* und *CrGUN4* Homologe ausgeschlossen werden. Das Ausbleiben der Stimulation der Reis MgCh durch *SynGUN4* und *CrGUN4* musste daher andere Ursachen haben.

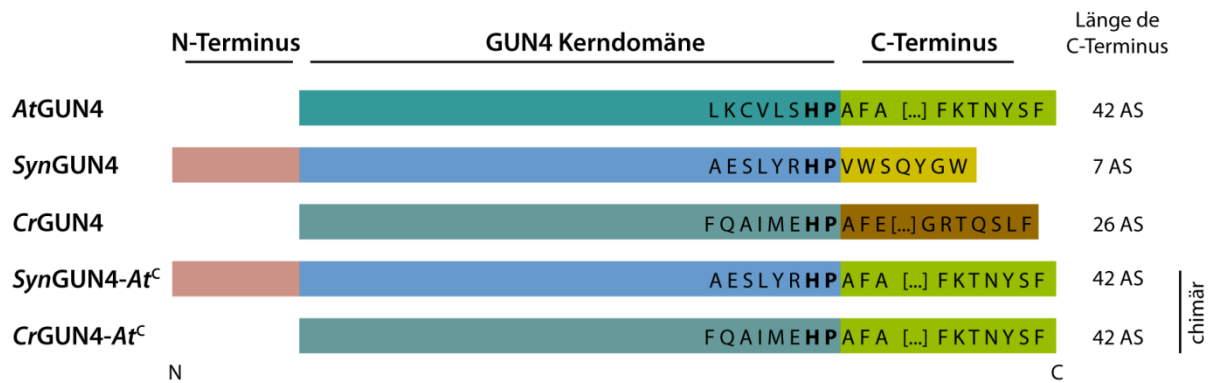


**Abbildung 3.42: Porphyrinbindungsstudien mit *Arabidopsis* (At), *Synechocystis* (Syn) und *Chlamydomonas* (Cr)GUN4(WT).**

Die Veränderung der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz (Trp-Fluo) wurde unter steigender Konzentration von ProtoIX (A, C, E) und MgP (B, D, F) gemessen. Das Maß der Bindung eines Liganden wurde als Zunahme des Quenchings dargestellt.  $n=2$  Messungen mit unterschiedlichen Proteinbatches. Die Trp-Fluo wurde für jede Konzentration in Triplikaten aufgenommen. Die Daten sind als Mittelwert über alle Messwerte angegeben. r.E.= relative Einheiten. Die hier gezeigten Ergebnisse wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von C. Hochheuser erzeugt. Diese Abbildung wurde in Richter et al. (2016b) veröffentlicht.

### 3.9.4 Analyse chimärer *Synechocystis* und *Chlamydomonas* GUN4-Proteine

Eine mögliche Ursache für die nur minimale Stimulationsfähigkeit der Reis MgCh durch die *Syn* und *Cr*GUN4 Homologe wurde in dem Fehlen der C-terminale Erweiterung, wie sie bei *At*GUN4 zu finden war, vermutet.



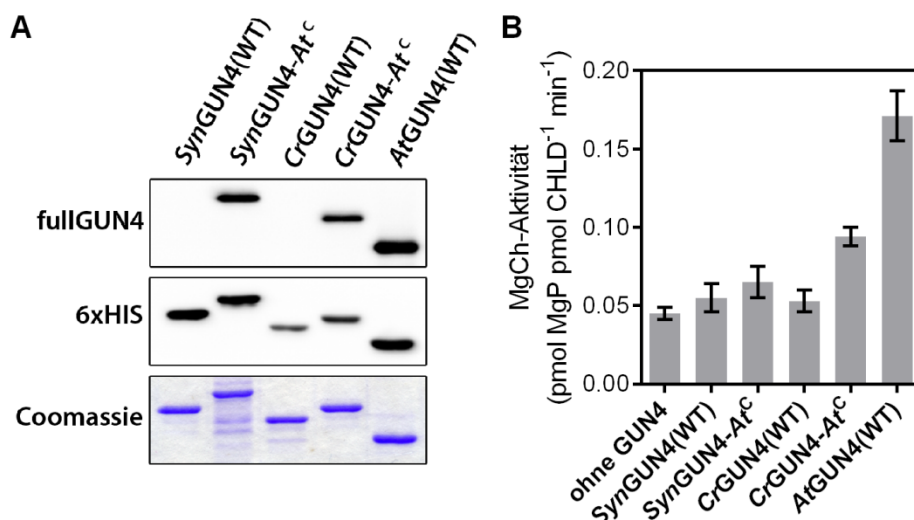
**Abbildung 3.43: Schematische Darstellung der GUN4-Proteine aus *Synechocystis* (*Syn*), *Chlamydomonas* (*Cr*) und *Arabidopsis* (*At*).**

Zusätzlich sind die aus dem N-Terminus (Kerndomäne) von *Syn* oder *Cr*GUN4 und *At*GUN4 C-Terminus (At<sup>C</sup>) bestehenden Chimäre *Syn*GUN4-At<sup>C</sup> und *Cr*GUN4-At<sup>C</sup> dargestellt. Die Länge des C-Terminus der WT Proteine, als auch der Chimäre ist angegeben. Relationen zwischen den Bereichen nicht maßstabsgerecht. AS= Aminosäuren.

Daher wurden Konstrukte, die zur Expression und Aufreinigung chimärer *Syn* und *Cr*GUN4-Proteine genutzt werden sollten, erzeugt (Abbildung 3.43). Der native C-Terminus von *Syn*GUN4 hatte eine Länge von 7 AS, der des *Cr*GUN4 eine Länge von 26 AS. Diese C-Termini wurden gegen die kodierende Sequenz des *At*GUN4 C-Terminus (42 AS) ausgetauscht (Abbildung 3.43). Die erzeugten chimären Proteine - *Syn*GUN4-At<sup>C</sup> und *Cr*GUN4-At<sup>C</sup> - wurden rekombinant exprimiert und aufgereinigt (Abbildung 3.44 A).

Eine Western-Blot-Analyse der aufgereinigten Proteine bestätigte den Austausch der C-Termini in *Syn*GUN4-At<sup>C</sup> und *Cr*GUN4-At<sup>C</sup> (Abbildung 3.44 A). Während die *Syn* und *Cr*GUN4(WT) Proteine nicht detektiert wurden, führte die Fusion dieser Proteine mit dem *At*GUN4 C-Terminus zu einer immunoreaktiven Bande mit dem gegen das *At*GUN4 gerichteten fullGUN4 Antikörper (Abbildung 3.44 A). Ein Western-Blot mit dem HIS-tag spezifischen Antikörper und ein mit Coomassie gefärbtes SDS-Gel bestätigten die Präsenz aller GUN4-Varianten (Abbildung 3.44 A).





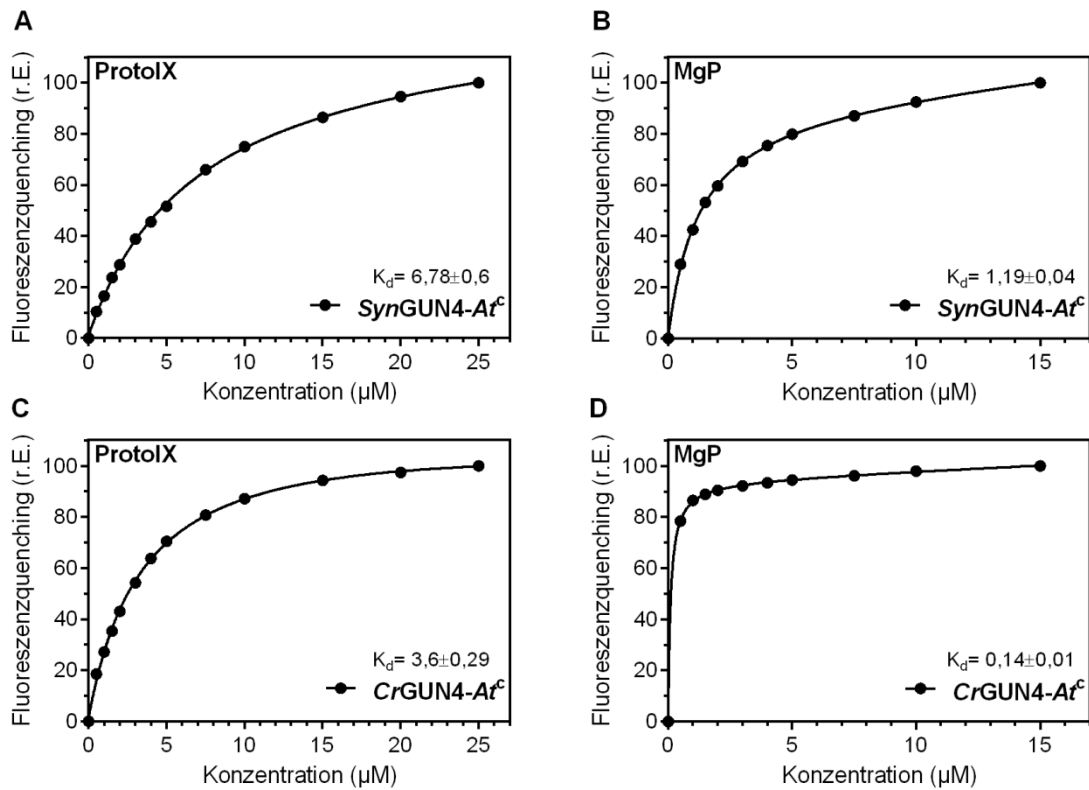
**Abbildung 3.44: In vitro MgCh-Assay mit chimären GUN4-Proteinen.**

(A) Analyse der rekombinanten GUN4-Proteine exprimiert in *E.coli* und aufgereinigt per HIS-tag. Analysiert wurden *Synechocystis* (*Syn*), *Chlamydomonas* (*Cr*) und *Arabidopsis* AtGUN4(WT) sowie die aus dem N-Terminus von *Syn* oder *Cr*GUN4 und AtGUN4 C-Terminus (At<sup>C</sup>) bestehenden Chimäre *Syn*GUN4-At<sup>C</sup> und *Cr*GUN4-At<sup>C</sup>. Gezeigt ist ein Coomassie gefärbtes Gel, sowie die Western-Blot-Analyse mit dem Antikörper der gegen das vollständige AtGUN4 gerichtet ist (fullGUN4). Zusätzlich wurde der HIS-tag (N-terminal) mittels HIS-tag-Antikörper detektiert (6xHIS). (B) MgCh-Assay mit den aufgereinigten GUN-Proteinen.

Die zuvor isolierten GUN4 Proteine wurden in einem MgCh-Assay analysiert. Während das AtGUN4(WT) eine 3fache Stimulation der MgCh-Aktivität im Vergleich zur Reaktion ohne GUN4 zeigte, konnten die *Syn* und *Cr*GUN4(WT) Proteine keine Stimulation der Reis MgCh bewirken (Abbildung 3.44 B). Auch wenn die beobachtete Zunahme der MgCh-Stimulation durch *Syn*GUN4-At<sup>C</sup> und *Cr*GUN4-At<sup>C</sup> nur marginal erschien, führte die Verknüpfung des *Cr*GUN4 mit dem AtGUN4 C-Terminus zu einer 100%igen Steigerung der MgP Produktion im Vergleich zu einem Ansatz ohne GUN4 oder mit *Cr*GUN4(WT) (Abbildung 3.44 B). Das AtGUN4(WT) Protein führte zu einer MgCh-Aktivität von 0,171 pmol MgP pro pmol CHLD und Minute. In Anwesenheit von *Cr*GUN4(WT) erzeugte die Reis MgCh 0,053 pmol MgP pro pmol CHLD und Minute (vergleichbare Aktivität wie ohne GUN4). Hingegen führte die Anwesenheit des GUN4 C-Terminus in *Cr*GUN4-At<sup>C</sup> zu Raten von 0,094 pmol MgP pro pmol CHLD und Minute (Abbildung 3.44 B). Dies entsprach einer Verdopplung der Stimulationsrate der Reis MgCh-Aktivität im Vergleich zum *Cr*GUN4(WT). Das *Syn*GUN4-At<sup>C</sup> Protein zeigte dieselbe Stimulation der MgCh wie das *Syn*GUN4(WT).

Die Verknüpfung der *Syn* und *Cr*GUN4-Proteine mit dem AtGUN4 C-Terminus hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Porphyrinbindungsaffinität der chimären Proteine. Die für die *Syn*GUN4-At<sup>C</sup> und *Cr*GUN4-At<sup>C</sup> ermittelten  $K_d$ -Werte für ProtoIX und MgP lagen im Bereich der zuvor ermittelten Affinitäten (Abbildung 3.45). Für das *Syn*GUN4-At<sup>C</sup> wurde für ProtoIX ein  $K_d = 6,78 \pm 0,6 \mu\text{M}$  und für MgP ein  $K_d = 1,19 \pm 0,04 \mu\text{M}$  ermittelt. Für *Cr*GUN4-At<sup>C</sup> wurde für ProtoIX ein  $K_d = 3,6 \pm 0,29 \mu\text{M}$  und für MgP ein  $K_d = 0,14 \pm 0,01 \mu\text{M}$  bestimmt.

Eine geringere oder gar höhere Affinität des chimären *Cr*GUN4-*At*<sup>C</sup> Proteins gegenüber den Porphyrinen, war daher nicht verantwortlich für die Zunahme der Stimulation der Reis MgCh.

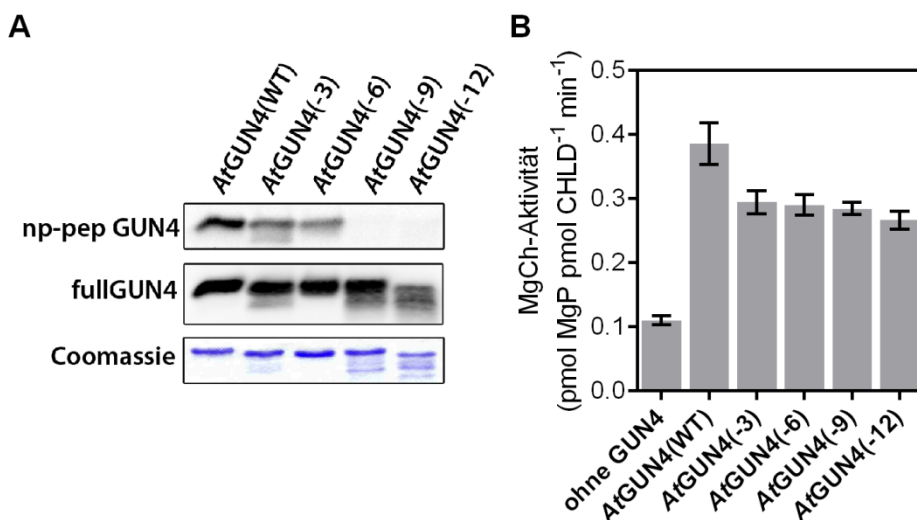


**Abbildung 3.45: Porphyrinbindungsstudien mit chimären GUN4 Fusionsproteinen.**

Die Chimäre setzten sich aus dem *Synechocystis* (*Syn*) und *Chlamydomonas* (*Cr*) N-Terminus (Kerndomäne) und *At*GUN4 C-Terminus (*At*<sup>C</sup>) (*Syn*GUN4-*At*<sup>C</sup> und *Cr*GUN4-*At*<sup>C</sup>) zusammen. Die Veränderung der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz (Trp-Fluo) wurde unter steigender Konzentration von ProtoIX (A, C) und MgP (B, D) gemessen. Das Maß der Bindung eines Liganden wurde als Zunahme des Quenchings dargestellt. n=2 Messungen mit unterschiedlichen Proteinbatches. Die Trp-Fluo wurde für jede Konzentration in Triplikaten aufgenommen. Die Daten sind als Mittelwert (n=2 unabhängige Messungen) über alle Messwerte angegeben. r.E.= relative Einheiten.

### 3.9.5 *In vitro* MgCh-Assay mit C-terminal verkürzten GUN4-Proteinen

In einem weiteren Experiment sollte der Einfluss der Länge des AtGUN4 auf die Stimulation der MgCh untersucht werden. Hierfür wurden bakterielle Expressionskonstrukte erstellt, die für C-terminal verkürzte AtGUN4 kodierten. Das GUN4 wurde dabei um 3, 6, 9 und 12 Aminosäuren (AS) verkürzt (Abbildung 3.46).



**Abbildung 3.46: *In vitro* MgCh-Assay mit verkürzten *Arabidopsis* (At)GUN4-Proteinen.**

(A) Analyse der rekombinanten GUN4-Proteine, verkürzt um 3, 6, 9, 12 Aminosäuren, exprimiert in *E.coli* und aufgereinigt per HIS-tag. Gezeigt ist ein Coomassie gefärbtes Gel, sowie die Western-Blot-Analyse mit dem C-terminus spezifischen AtGUN4 Antikörper (np-pep GUN4) und dem gegen das vollständige Proteine gerichtete Antikörper (fullGUN4). (B) MgCh-Assay mit den verkürzten GUN4 Varianten. Mit abnehmender Länge des GUN4-Proteins nahm die Stimulationsfähigkeit der OsMgCh durch GUN4 ab. Diese Abbildung wurde in Richter et al. (2016b) veröffentlicht.

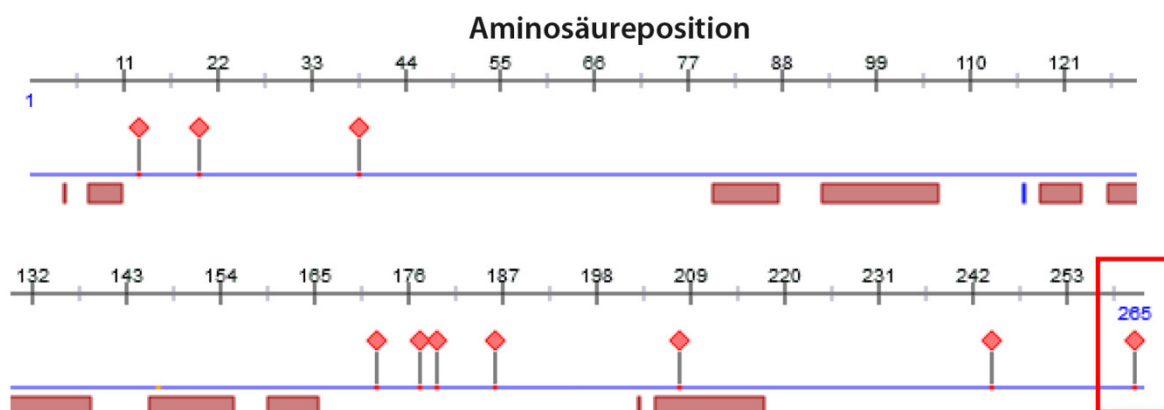
Die verkürzten Proteine wurden aus einer bakteriellen Zellkultur aufgereinigt und mittels Western-Blot analysiert. Mit Ausnahme des AtGUN4(-12) wurden alle Proteine gleichermaßen durch den fullGUN4 Antikörper detektiert (Abbildung 3.46 A, „fullGUN4“). Auch auf dem Coomassie gefärbten Gel waren alle verkürzten Proteine erkennbar. Die Bestätigung der schrittweisen Verkürzung des AtGUN4 erfolgte mit einem Antikörper, welcher die letzten 13 AS des GUN4 C-Terminus erkannte (*non-phosphospecific peptide* GUN4/ np-pepGUN4). Mit abnehmender Länge der AtGUN4-Proteine (von WT bis -12 AS) nahm die Signalintensität des np-pepGUN4 Antikörpers ab. Während die AtGUN4(-3) und AtGUN4(-6) Proteine noch erkannt wurden, führte die Verkürzung um 9, bzw. 12 AS zum Ausbleiben eines Western-Blot-Signales mit dem np-pepGUN4 Antikörper (Abbildung 3.46 A).

Der mit diesen AtGUN4-Proteinen durchgeführte *in vitro* MgCh-Assay zeigte, dass die sequentielle Verkürzung des AtGUN4s zu einer graduellen Abnahme der MgCh führte (Abbildung 3.46 B). Interessanterweise führte bereits der Verlust der letzten drei AS zu einer deutlichen Abnahme der

Stimulationsfähigkeit der MgCh um circa 30% im Vergleich zum WT-Protein (Abbildung 3.46 B). Innerhalb dieser 3 Aminosäuren (Tyrosin-Serin-Phenylalanin) befand sich auch die Phosphorylierungsstelle des GUN4s aus Angiospermen.

### 3.9.6 Vorhersage einer Protein-Protein-Interaktionsfläche im C-Terminus des *Arabidopsis* GUN4

Die beobachtete Notwendigkeit der Anwesenheit der letzten drei AS innerhalb des GUN4 C-Terminus wurde zusätzlich durch den folgenden Befund untermauert. Ein zur Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionsflächen erstelltes neuronales Netzwerk (PredictProtein, Yachdav et al. (2014)) hat mehrere dieser Interaktionsflächen in AtGUN4 identifiziert (Abbildung 3.47, rote Rauten). Eine Interaktionsfläche meint dabei eine, oder mehrere AS, die an einer möglichen Protein-Protein-Interaktion beteiligt sein könnte(n). Die Vorhersage dieser Eigenschaft durch das neuronale Netzwerk basiert dabei auf der Analyse experimentell untersuchter Protein-Protein-Interaktionen (Hauptsächlich Kristallstrukturen von interagierenden Proteinen). Durch das Training des Netzwerks mit Informationen, wie zum Beispiel, dass das Motiv „Tyrosin-Serin-Phenylalanin“ an einer Proteininteraktion von Protein X mit Protein Y beteiligt ist, werden diese Motive (in einem strukturellen Kontext) verallgemeinert. Das Netzwerk kann somit Vorhersagen über Proteininteraktionsflächen in beliebigen Proteinen treffen.



**Abbildung 3.47: Vorhersage von Protein-Protein-Interaktionsflächen in *Arabidopsis* (At)GUN4(WT).**

Die Vorhersage von Aminosäuren, welche an einer möglichen Proteininteraktion des AtGUN4 beteiligt sind (rote Rauten), erfolgte durch den PredictProtein-Algorithmus ([www.predictprotein.org](http://www.predictprotein.org); Stand Juni 2016). Der Zahlenstrahl gibt die Aminosäureposition an. Rote Balken: vorhergesagte Helices der 3D-Struktur. Das Phenylalanin an Position 265 wurde als Grenzfläche für eine mögliche Protein-Protein-Wechselwirkung identifiziert.

Neben weiteren, auf die an dieser Stelle nicht eingegangen werden soll, wurde eine Protein-Protein-Interaktionsfläche im C-Terminus von AtGUN4 an Position 265 (Phenylalanin) identifiziert (Abbildung 3.47, roter Kasten). Das Phe265 war hochkonserviert (siehe Abbildung 3.39, S.182) und der Verlust im AtGUN4-Protein führte zu einer Abnahme der MgCh-Stimulation (Abbildung 3.46).

### **3.9.7 Zusammenfassung zum Einfluss des C-Terminus auf die Funktion von GUN4**

Die Experimente zum Einfluss des C-Terminus auf die Eigenschaften des GUN4-Proteins ergaben, dass sich dieser im Laufe der Evolution (oxygenen) photosynthetisch aktiver Organismen in der Gruppe der Angiospermen entwickelte. Die Verlängerung des GUN4 aus Angiospermen wurde im Verlauf der Evolution durch die Entstehung der Phosphorylierungsstelle im C-Terminus begleitet. Ferner wurde beobachtet, dass der flexible GUN4 C-Terminus einen positiven Einfluss auf die Stimulation der MgCh hatt, ohne die porphyrinbindende Eigenschaft des GUN4 Proteins zu beeinflussen.

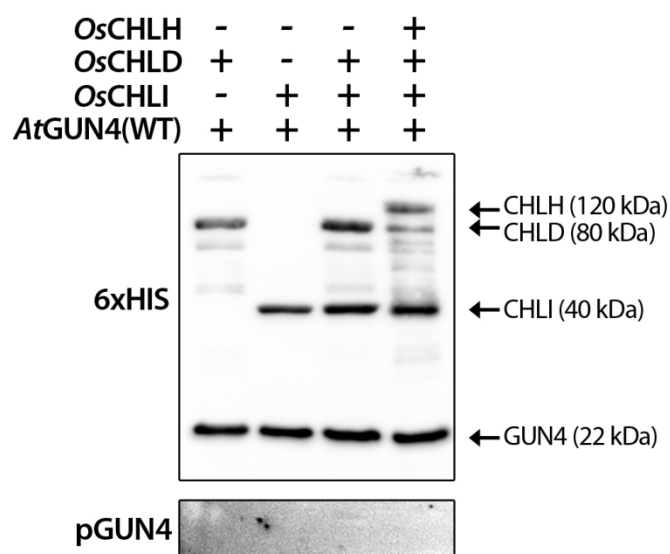


### 3.10 Versuch der Identifizierung der GUN4-Kinase (GUK)

Eines der formulierten Ziele der vorliegenden Arbeit war es, die Proteinkinase, die GUN4 phosphoryliert, zu identifizieren. In dem folgenden Komplex von Experimenten wurde die GUN4-Phosphorylierung durch bekannte plastidenlokalisierte Kinasen untersucht. Zusätzlich wurden biochemische und chromatografische Verfahren zur Isolation der GUK-Aktivität aus *At* Chloroplastenextrakten angewandt.

#### 3.10.1 GUN4 wird nicht während der MgCh-Reaktion phosphoryliert

Die MgCh Untereinheit I (CHLI) besitzt die für die MgCh-Reaktion benötigte ATPase-Aktivität. Ferner weist CHLD die für eine ATP-Hydrolyse notwendigen Aminosäuren auf (Hansson und Kannangara, 1997; Jensen et al., 1998; Jensen et al., 1999a; Lundqvist et al., 2010). Daher wurde überprüft, ob die ATP-Hydrolyse während einer MgCh-Reaktion zur Übertragung eines Phosphatrestes auf GUN4 führte.



**Abbildung 3.48: Untersuchung des GUN4-Phosphorylierungsstatus nach einem *in vitro* MgCh-Aktivitätsassay.**

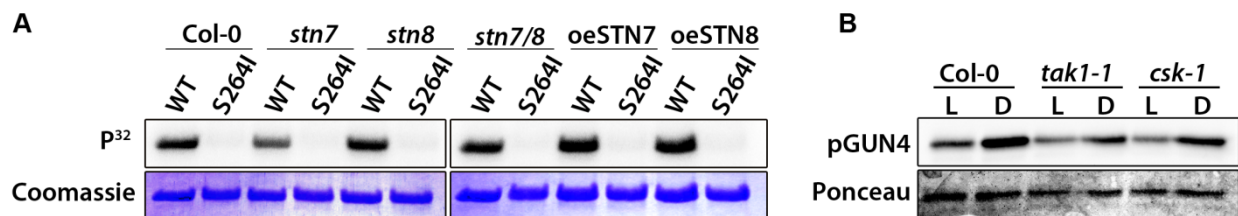
Es wurde ein vollwertiger MgCh-Assay mit verschiedenen Kombinationen der rekombinanten Reis (*Oryza sativa* (*Os*)) MgCh-Untereinheiten und *Arabidopsis* (*At*)GUN4(WT) durchgeführt (Vergleich Abschnitt 3.3.3, S.148). Am Ende des Assays wurde dieser durch Zugabe von Ladepuffer abgestoppt und die rekombinanten Proteine per Western-Blot analysiert. Die rekombinanten Proteine wurden mittels 6xHIS-tag Antikörper detektiert. Eine mögliche Phosphorylierung von AtGUN4 während des MgCh-Assay wurde mit dem phosphorylierungsspezifischen GUN4 Antikörper (pGUN4) analysiert. Die Molekulargewichte der rekombinanten Proteine sind angegeben. Diese Abbildung wurde in Richter et al. (2016b) veröffentlicht.

Für diese Fragestellung wurden die rekombinanten MgCh Untereinheiten H, D, I und das GUN4-Protein nach einem MgCh-Assay auf einem Proteingel aufgetrennt und per Western-Blot analysiert (Abbildung 3.48). Unabhängig von der Kombination der einzelnen MgCh-Untereinheiten mit dem GUN4-Protein, zeigte sich keine Phosphorylierung von GUN4 nach einem MgCh-Assay. Weder die

Inkubation von CHLD, noch von CHLI mit GUN4, oder von allen drei MgCh Untereinheiten mit GUN4 führte zu einer Übertragung eines Phosphatrestes auf GUN4 (Abbildung 3.48, „pGUN4“).

### 3.10.2 GUN4 wird nicht durch STN7/8, TAK1 oder CSK phosphoryliert

Auf der Suche der nach der GUK wurde die Phosphorylierung in Mutanten bereits bekannter Kinasen analysiert. Das Saatgut der Mutanten wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen bereitgestellt. Vor dem eigentlichen Versuch wurde das Saatgut von Mutanten für die *STATE TRANSITION KINASEN 7* und *8* (*stn7/8*, Mutantenlinien Wunder et al. (2013a); Wunder et al. (2013b)), die *CHLOROPLAST SENSOR KINASE* (*csk-1*, Puthiyaveetil et al. (2008)) und die *THYLAKOID ASSOCIATED KINASE 1* (*tak1-1*, Snyders und Kohorn (1999); Snyders und Kohorn (2001)) zunächst ausgebracht und der Genotyp mittels PCR bestätigt (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.49: GUN4-Kinaseassay mit Extrakten von Mutanten bekannter plastidenlokalisierter Proteinkinasen.** (A) Kinaseassay mit Extrakten von STATE TRANSITION KINASE 7 (*stn7*), beziehungsweise *stn8* Mutanten. Analysiert wurde die Phosphorylierung von rekombinanten *Arabidopsis* GUN4(WT) (WT) und GUN4(S264I) (S264I). oeSTN7/8= Überexpressionslinie von STN7/8. Der Assay wurde mit radioaktiv markiertem ATP ( $P^{32}$ ) durchgeführt. Als Ladekontrolle ist das Coomassie gefärbte SDS-Gel gezeigt. (B) Kinaseassay mit Extrakten von THYLAKOID ASSOCIATED KINASE 1 MUTANTEN (*tak1-1*), beziehungsweise einer CHLOROPLAST SENSOR KINASE MUTANTE (*csk-1*). Das Phosphorylierungssignal wurde mit dem phosphorylierungsspezifischen pGUN4-Antikörper nachgewiesen. Als Ladekontrolle ist die Ponceau gefärbte Membran nach dem Western-Blot gezeigt. Analysiert wurde die lösliche Fraktion des Kinaseassay. L/D= Kinaseassay im Licht/Dunkelheit. Diese Abbildung wurde in Richter et al. (2016b) veröffentlicht.

Aus der Analyse der Mutantenlinien von STN7/8 ging hervor, dass weder der *knockout* noch die Überexpression von STN7/8 einen Einfluss auf die Phosphorylierung des rekombinanten AtGUN4(WT) hatte (Abbildung 3.49 A). Ferner wurde eine WT-artige Phosphorylierung von GUN4 durch Extrakte der *tak1-1* oder *csk-1* Linien im Licht oder der Dunkelheit beobachtet (Abbildung 3.49 B).

Daher konnte ausgeschlossen werden, dass diese bekannten plastidären Kinasen für die Phosphorylierung von GUN4 verantwortlich waren.



### 3.10.3 Isolation der GUK-Aktivität mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

Aufgrund der Tatsache, dass zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit nur wenige plastidäre Kinasen beschrieben waren (siehe Einleitung) und sich die bis dato am besten untersuchten Kinasen nicht für die GUN4-Phosphorylierung verantwortlich zeigten, wurde ein anderer experimenteller Weg zur Identifizierung der GUK eingeschlagen.

Durch die biochemische Auftrennung von Proteinen und Proteinkomplexen isolierter *At* Chloroplasten wurden Fraktionen gewonnen, welche die GUK-Aktivität enthielten. Jene Fraktionen wurden anschließend per Massenspektrometrie auf die Anwesenheit putativer GUK überprüft.

In einem ersten Experiment wurden solubilisierter *At* Chloroplasten beziehungsweise die enthaltenen Proteine und Proteinkomplexe entsprechend ihrer Dichte (Molekularmasse) in einem Saccharosegradienten durch Zentrifugation aufgetrennt (Abbildung 3.50 A). Die gewonnenen Fraktionen zeigten eine dem Bandenmuster des Gradienten (Abbildung 3.50 A) entsprechende Chl-Verteilung (Abbildung 3.50 B). Diese war auf die von der Molekularmasse abhängige Migration von Chl-bindenden Proteinen und Proteinkomplexen, wie zum Beispiel des Photosystem (PS) I oder PSII, innerhalb des Dichtegradienten zurückzuführen. Aliquots der entnommenen Fraktionen (Abbildung 3.50 B), wurden mit rekombinantem *At*GUN4(WT) Protein in einem Kinaseassay inkubiert und anschließend auf die GUN4-Phosphorylierung untersucht.

Aus dem Western-Blot-Ergebnis des Kinaseassay mit den Fraktionen des Saccharosegradienten (Abbildung 3.50 C, pGUN4-Signal) wurde ersichtlich, dass die GUK-Aktivität sowohl in den Fraktionen des hochmolekularen Bereiches (stärkste Signale in Fraktion 6-8) als auch des niedermolekularen Bereiches (stärkste Signale in Fraktion 21 und 22) detektiert werden konnte. Auffällig war dabei, dass diese Fraktionen, im Vergleich zu den anderen, stark reduzierte Chl-Gehalte aufwiesen (Abbildung 3.50 B). Die Fraktionen 6-7 enthielten hochmolekulare Proteinkomplexe, welche größer als der PSI-Komplex (ca 600-700 kDa) waren. Die Fraktionen 21 und 22 entsprachen eher dem niedermolekularen Bereich, in dem Monomere oder kleinere Proteinkomplexe vorlagen. Die Fraktionen 21 und 22 wurden anschließend per Massenspektrometrie analysiert. Das Ergebnis dieser Analyse wird in Abschnitt 3.10.5 (S. 203) gezeigt.



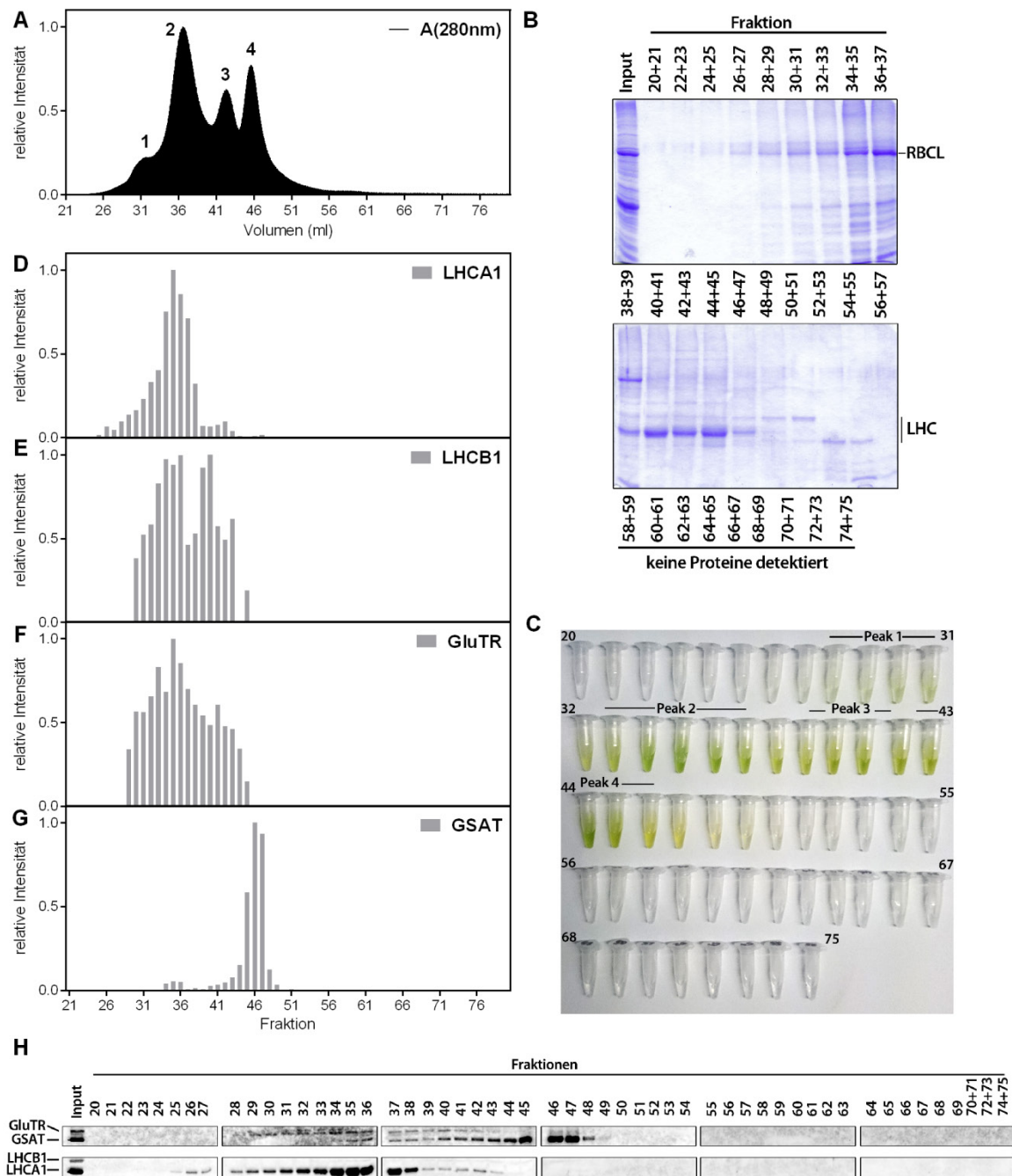
**Abbildung 3.50: Versuch der Identifizierung der GUN4-Kinase mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation eines solubilisierten Chloroplastenextraktes von *Arabidopsis*.**

(A) Saccharose-Dichtegradient nach Ultrazentrifugation. Die Proteinkomplexe des Chloroplastenextraktes trennten sich entlang des Gradienten auf (5% Saccharose= niedermolekulare Proteine/Komplexe; 22,5 % Saccharose = hochmolekulare Proteinkomplexe). Die Zuordnung der Chl-bindenden Proteinkomplexe erfolgte nach Zhang et al. (2010) (B) Entnommene Fraktionen des Gradienten aus (A). Jeweils 0,5 ml Fraktionen wurden vom Boden (Fraktion 1) hin zum Beginn des Gradienten (Fraktion 26) entnommen. Fraktion 25 und 26 entsprechen dem aufgetragenen Volumen des Chloroplastenextraktes. (C) Western-Blot-Analyse eines Kinaseassays mit den Fraktionen des Saccharosegradienten gegen rekombinantes AtGUN4. Die Phosphorylierung des angebotenen Substrates (AtGUN4) wurde mit einem phosphorylierungsspezifischen GUN4 Antikörper (pGUN4) analysiert. Die Ponceau gefärbte Membran zeigt das rekombinante AtGUN4 in den im SDS-Gel aufgetrennten Kinaseassay-Reaktionen. Eine erhöhte GUK-Aktivität wurde in den Fraktionen 6,7,8 (hochmolekularer Bereich) sowie in den Fraktionen 21 und 22 (niedermolekularer Bereich) detektiert.

Aus diesem Experiment konnte geschlussfolgert werden, dass die GUK sowohl als monomeres Protein (niedermolekularer Bereich), als auch als Teil eines hochmolekularen Proteinkomplexes in einem Saccharosegradienten migriert.

### 3.10.4 Isolation der GUK-Aktivität mittels Größenausschlusschromatografie

Zusätzlich zur Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation sollte der Versuch unternommen werden, die GUK durch die biochemische Auftrennung plastidärer Proteine mittels Größenausschlusschromatographie (engl. *size exclusion chromatography*, SEC) zu isolieren. Dieses chromatographische Trennverfahren basiert auf dem Prinzip der unterschiedlichen Verteilung von Proteinen verschiedener Größe (Molekulargewicht) zwischen einer mobilen und einer stationären Phase. Als mobile Phase wird in der Regel ein wässriger Puffer eingesetzt, welcher über ein *fast protein liquid chromatography* (FPLC)-System transportiert wird. Anders als bei anderen chromatographischen Methoden wird die Trennung bei der SEC nicht über chemische Wechselwirkungen der Substanzen mit der stationären Phase, sondern über unterschiedliche Diffusionsstrecken der Proteine innerhalb der stationären Phase erzielt. Als stationäre Phase wurde eine Sephacryl(300)-Matrix verwendet. Diese bestand aus sphärischen Partikeln, welche Poren unterschiedlicher Größe aufweisen. Während Proteine mit geringer Größe in diese Poren diffundieren konnten, passierten größere Proteine und Proteinkomplexe die stationäre Phase ohne mit der Matrix in Wechselwirkung zu treten. Kleinere Proteine mussten folglich eine längere Strecke - durch bzw. in die Poren und wieder heraus - zurücklegen und eluierten daher später von der Säule als größere Protein und Proteinkomplexe. Die Elution der Proteine wurde durch die Absorption aromatischer Aminosäuren bei 280 nm verfolgt. Da die im Rahmen dieses Experimentes genutzte Säule eigenhändig gepackt wurde und diese Methode zunächst etabliert werden musste, wurde diese zunächst auf die Anwendbarkeit zur Auftrennung plastidärer Proteine und Proteinkomplexe getestet (Abbildung 3.51).

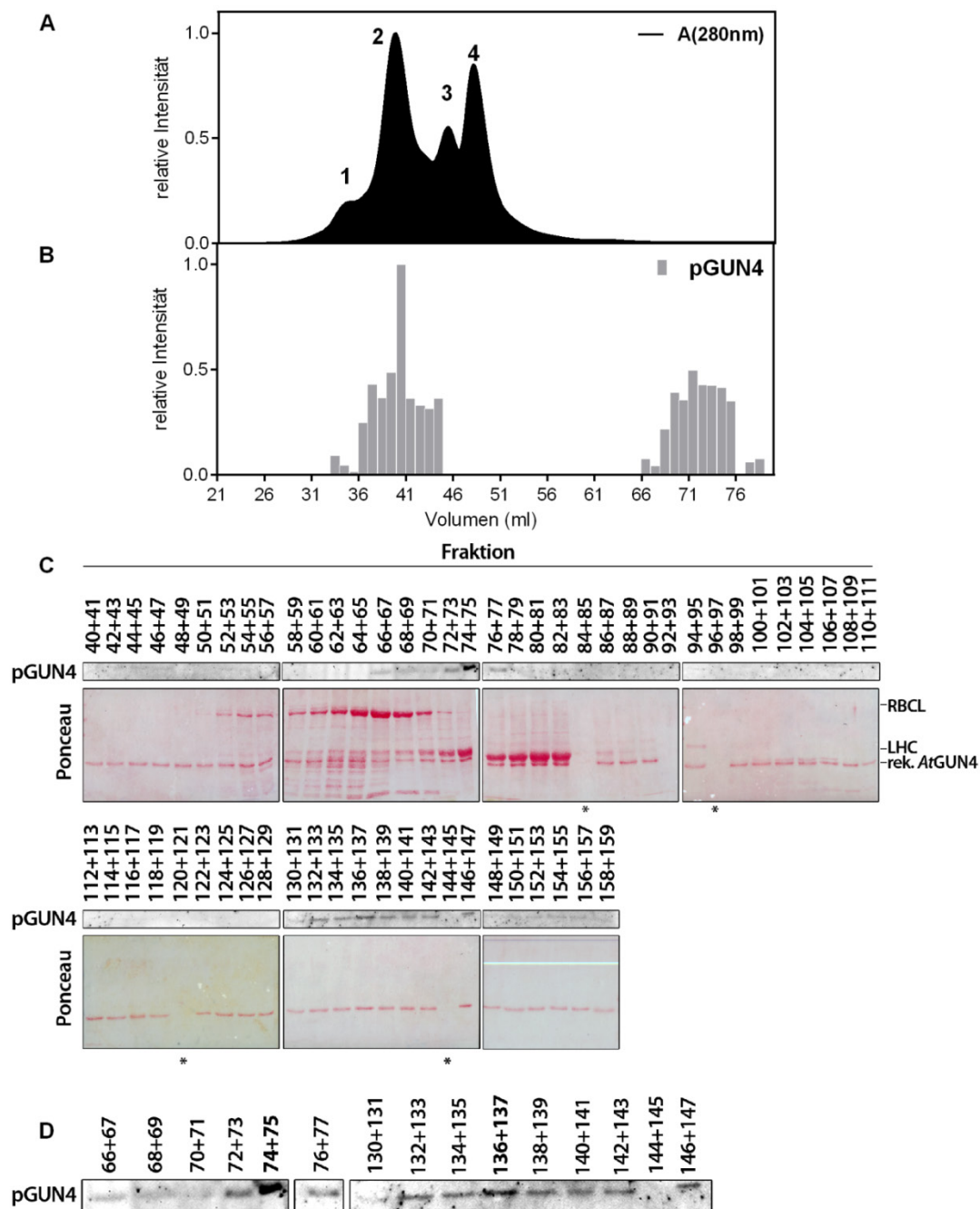


**Abbildung 3.51: Größenausschlusschromatografie (SEC) eines solubilisierten Chloroplastenextraktes von *Arabidopsis* zum Nachweis der Anwendbarkeit dieser Methode zur Größenfraktionierung.**

(A) Chromatogramm der Elution der Chloroplastenproteine (Absorption bei 280nm) getrennt auf einer eigenhändig erstellten Sephacryl S300/HR Säule (Bettvolumen ca. 80 ml). (B) Coomassie gefärbte SDS-Gele der SEC-Fractionen. Zwei Fractionen wurden kombiniert. (C) Fractionen, aufgefangen zu 1ml, der SEC und deren Chlorophyllgehalt. Die zu einem Maxima aus der UV-Spur. Input= 15 µg des solubilisierten Chloroplastenextraktes. (A) korrespondierenden Fractionen sind gegenzeichnet. (D-G) Densitometrische Quantifizierung der Western-Blot-Signale aus (H). (H) Western-Blot-Analyse von plastidären Proteinen in den SEC-Fractionen. Das Signal des LHCB1-Proteins in den Fractionen ist nur bei stärkerem Kontrast sichtbar. LHCA1/B1= LIGHT HARVESTING CHLOROPHYLL BINDING PROTEIN A1/B1, GluTR= GLUTAMYL t-RNA REDUCTASE, GSAT= GLUTAMAT-1-SEMIALDEHYD AMINOTRANSFERASE, RBCL= RUBISCO LARGE SUBUNIT.

Abbildung 3.51 A zeigt das aufgenommene Chromatogramm (Absorption bei 280 nm) eines per SEC aufgetrennten Chloroplastenextraktes von *At*. Bis zu einem Volumen von 21 ml wurde keine Absorption bei 280 nm detektiert. Danach konnten im Elutionsprofil einzelne Maxima für die Absorption aufgenommen werden (Abbildung 3.51 A, Peak 1-4). Diese korrespondierten mit der Elution von unterschiedlichen Proteinspezies/ Proteinkomplexen. Während mit Peak 2, neben anderen, der ca 600 kDa große RubisCO-Komplex (große (RBCL) und kleine Untereinheit) eluierte, fanden sich in den Fraktionen 40-47 (Peak 3 und 4 bei 41-47 ml Elutionsvolumen) Proteinkomplexe der Chl-bindenden Lichtsammelkomplexe (LHC) (zum Beispiel trimäre LHC oder PSII-LHCII) (Abbildung 3.52 A und B). Die Elutionspeaks korrelierten mit Fraktionen unterschiedlichen Chl-Gehaltes. Im Gegensatz zu den Fraktionen 28-31 des ersten Peaks und den Fraktionen zwischen den Maxima, zeigten die Fraktionen der folgenden Peaks 2, 3 und 4 einen deutlich höheren Chl-Gehalt (Abbildung 3.51 C). Die beobachtete Akkumulation von Chl in den Fraktionen der Maxima 3 und 4 korrelierte mit der Elution Chl-bindender Proteine (Abbildung 3.52 C). Eine anschließend durchgeführte Western-Blot-Analyse der Fraktionen zeigte zudem die unterschiedliche Elution einzelner Proteine. LHCA1 (Antennenkomplex des PSI) eluierte ausschließlich in Peak 2. Das LHCB1 Protein hingegen wurde auch in Peak 3 und 4 beobachtet (Abbildung 3.51 D, E, H). Auch die zwei analysierten Proteine der TBS zeigten eine unterschiedliche Verteilung in den Elutionsfraktionen. Während die Glutamy-tRNA Reduktase (GluTR) in den Fraktionen der Peaks 2 und 3 zu finden war, eluierte die Glutamat-1,2-Semialdehyd Aminotransferase (GSAT) ausschließlich in Peak 4 (Abbildung 3.51 F, G, H). Wenngleich die Absorption bei 280 nm erst nach der Fraktion 63 die Nulllinie erreichte, wurden in den vorhergehenden Fraktionen keine Proteine detektiert.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die erzeugte Säule und die entwickelte Methode zur Trennung von Proteinen/ Proteinkomplexen eines Chloroplastenextraktes geeignet ist.



**Abbildung 3.52: Versuch der Identifizierung der GUN4-Kinase mittels Größenausschlusschromatografie (SEC) eines solubilisierten Chloroplastenextraktes von *Arabidopsis*.**

(A) Chromatogramm der Elution von 4 mg Chloroplastenproteinen (Absorption bei 280nm), getrennt auf einer eigenhändig erstellten Sephacryl S300/HR Säule (Bettvolumen ca. 80 ml). Die Auftragung beginnt ab einem Elutionsvolumen von 21 ml (entspricht Fraktion 42). 147 Fraktionen wurden zu 500 µl aufgefangen. (B) Densitometrische Quantifizierung des pGUN4 Western-Blot-Signals aus (C). (C) Western-Blot-Analyse der SEC-Fractionen nach GUK-Assay mit rekombinantem AtGUN4 (rek. AtGUN4). Je zwei Fraktionen wurden zusammen analysiert. Die Position von Markerproteinen auf der Ponceau gefärbten Membran ist gekennzeichnet. LHC= LIGHT HARVESTING CHLOROPHYLL BINDING PROTEIN, RBCL= RUBISCO LARGE SUBUNIT. \*= Proben während der Präparation ausgefallen. (D) Vergrößerung des pGUN4-Signales für die Fraktionen mit GUK-Aktivität. Eine Anreicherung der GUK-Aktivität wurde im hochmolekularen (Fraktion 72-77) sowie niedermolekularen (Fraktion 132-143) Bereich beobachtet.

Nachdem die Anwendbarkeit der Methode geprüft war, erfolgte in einem zweiten Schritt die Auftrennung eines *At Col-0* Chloroplastenextraktes mit anschließendem Kinaseassay. Der Kinaseassay

wurde mit Aliquots der Fraktionen und rekombinantem GUN4 durchgeführt (Abbildung 3.52). Für diesen Versuch wurden die Fraktionen der SEC von 4 mg Chloroplastenprotein zu 500 µl aufgefangen. Bei einem Gesamtelutionsvolumen von 80 ml ergaben sich somit 160 Fraktionen (Abbildung 3.52 A). Teile der Fraktionen wurden mit rekombinantem GUN4 und ATP versetzt und der Grad der GUN4-Phosphorylierung mittels Western-Blot analysiert. Wie schon bei der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation beobachtet (Abschnitt 3.10.3, S.197), zeigte sich auch hier eine differentielle Verteilung der GUK-Aktivität in den einzelnen Fraktionen. Die stärkste Phosphorylierung von GUN4 wurde in den Fraktionen 74 und 75, welche kurz hinter Peak 2 der UV-Absorptionskurve und damit kurz nach dem RubisCO-Komplex (ca. 600 kDa) eluierten (Abbildung 3.51 und Abbildung 3.52 C, Ponceaufärbung). Zusätzlich wurde eine, wenngleich schwächere, GUN4-Phosphorylierung durch die Fraktionen 132-143 festgestellt (Abbildung 3.52 A-D). Obwohl im Vergleich zu den höhermolekularen Bereichen nur noch eine sehr geringe Absorption bei 280 nm detektiert werden konnte, eluierte die GUK ebenfalls im niedermolekularen Bereich (Abbildung 3.52 A und B).

Die Fraktionen 74 und 75, sowie die vereinigten Fraktionen 132-143 wurden anschließend per Massenspektrometrie analysiert. Das Ergebnis dieser Analyse wird in Abschnitt 3.10.5 (S.203) gezeigt.

In der Zusammenfassung lässt sich auch hier festhalten, dass die GUK Teil eines hochmolekularen Proteinkomplexes war, welcher mit der SEC von anderen Proteinkomplexen der Chloroplasten getrennt werden konnte.

### 3.10.5 Übersicht zu den identifizierten GUK-Kandidaten

Die in Abschnitt 3.10.3 und 3.10.4 erzeugten Fraktionen der SEC und SDG, die eine GUK-Aktivität zeigten, wurden hinsichtlich der enthaltenen Proteine per Massenspektrometrie analysiert. Tatsächlich konnten eine Vielzahl von Proteinkinasen in diesen Fraktionen identifiziert werden (Tabelle XIX).

Zusätzlich wurde eine *in silico* Analyse mit Hilfe von Datenbanken durchgeführt. Hierfür wurde die RIKEN Arabidopsis Phenome Information DB, Chloroplast 2010 / Chloroplast Phenomics und die Chloroplast Function DB II genutzt. Diese Datenbanken enthalten (phänotypische) Untersuchungen von Mutanten deren Gene im Zellkern kodiert und in den Plastiden lokalisiert sind. Die Zuordnung, ob ein Protein im Chloroplasten lokalisiert ist oder nicht, basierte dabei auf Vorhersagen der Lokalisierung anhand des Vorhandenseins eines Transitpeptides für den Chloroplastenimport. Ferner wurden massenspektrometrische Analysen subzellulärer Fraktionen zum Nachweis der Lokalisation genutzt. Die ausgewählten Datenbanken enthielten somit eine Vorauswahl plastidenlokalisierter Proteine. Die Datenbanken wurden mit einem der folgenden Stichworte „*protein kinase family*“,

„putative protein kinase“ oder „protein kinase“ durchsucht. Die somit zusätzlich identifizierten putativen Proteinkinasen sind ebenfalls in Tabelle XIX dargestellt (Quelle: „DB“).

Eine zusätzliche Proteinkinase (PK17, bzw. PKU13) wurde durch eine Co-Expressionsanalyse mit GUN4 identifiziert (*guilt by association*).

Allen identifizierten Kinasen war eine Annotation (TAIR10) als „protein kinase family“ gemein. Zur Verallgemeinerung wurden die Kinasen mit einer einheitlichen Abkürzung „PK“ (für Protein Kinase) und einer Nummer versehen unabhängig von der tatsächlichen Lokalisierung und eventuell vorhandener Zusatzinformationen über eine mögliche Funktion innerhalb einer Pflanzenzelle.

Im Laufe der durchgeführten Experimente zeigte sich, dass die PK1, 2, 3, 5, 12 und 13 tatsächlich im Plastiden lokalisiert waren. Daher wurden jene in PLASTID PROTEIN KINASE WITH UNKNOWN FUNCTION (PKU) umbenannt (Richter et al., 2016a).

Neben diesen PKU wurden bereits annotierte und untersuchte Kinasen in den Fraktionen der SEC und SDG identifiziert. Die PK14 entsprach der BRASSINOSTEROID-SIGNALING KINASE 8 (BSK8), für die eine Funktion außerhalb des Chloroplasten publiziert wurde (Sreeramulu et al., 2013). PK16 wurde als eine Rezeptor-Kinase XIP1 (XYLEM INTERMIXED WITH PHLOEM 1) identifiziert, die einen Einfluss auf die Lignifizierung von Zellen und die Ausbildung von Xylem und Phloem haben soll (Bryan et al., 2012). PKU12 wurde im Jahr 2006 als in den Plastoglobuli lokalisierte ABC1-LIKE KINASE (ABC1K9) identifiziert, jedoch nicht eingehender untersucht (Ytterberg et al., 2006). Die Annotation des entsprechenden Gens (AT5G05200) wurde bis dato nicht vervollständigt (in TAIR 10), sodass jene zunächst unter dem Namen PKU12 analysiert wurde. Die PKU12/ABC1K9 wurde sowohl in den Fraktionen der SDG, als auch der SEC identifiziert. Neben dieser wurden auch die ABC1K1 und ABC1K3 in den Fraktionen der SEC gefunden.



**Tabelle XIX: Übersicht der in dieser Arbeit analysierten und identifizierten Proteinkinasen.**

Zusammengefasst sind die Kinasen, welche durch Datenbanksuche (DB), Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation (SDG), Größenausschluss-Chromatographie (SEC) oder Co-Expression (CoEx) mit *Arabidopsis* GUN4 identifiziert wurden. Die Vorhersage der Lokalisation wurde mit der SUBAIII-Datenbank vorgenommen. MS, massenspektrometrische Analyse; GFP= GFP-Lokalisationsstudie; PM, Plasmamembran; PL, Plastid; ZK, Zellkern; Cy, Cytosol; pred, Vorhersage. PKU= PLASTID PROTEIN KINASE WITH UNKNOWN FUNCTION. PK8 und 9 wurden nach weiteren Vergleichen als THYLAKOID ASSOCIATED KINASE 1, beziehungsweise CHLOROPLAST SENSOR KINASE identifiziert. PK14 und PK16 wurden nicht weitergehend analysiert, da für diese Kinasen Funktions- und Lokalisationsbeschreibungen außerhalb der Chloroplasten vorlagen. PK17 wurde im Verlauf der Arbeit in PKU13 umbenannt. PKU, PLASTID PROTEIN KINASE WITH UNKNOWN FUNCTION; PK, PROTEIN KINASE

Name	ATG	Beschreibung (TAIR10)	Quelle	Lokalisation (SUBAIII)	Referenz
PKU1	AT5G61560	U-box domain-containing protein kinase family protein	DB	PL (MS) & PM (MS)	
PKU2	AT1G67520	lectin protein kinase family protein	DB	PL (GFP)	
PKU3	AT3G51990	Protein kinase superfamily protein	DB	PL (pred)	
PK4	AT1G76370	Protein kinase superfamily protein	DB	PL (MS) & PM (MS)	
PKU5	AT3G61080	Protein kinase superfamily protein / fructosamine kinase family protein	DB	PL (MS)	
PK6	AT4G18250	Receptor serine/threonine kinase, putative	DB	PM (MS)	
PK7	AT2G39190	ATATH8 / member of ATH subfamily	DB	PL (pred)	
PK10	AT1G18160	Protein kinase superfamily protein	SDG	Cy (pred)	
PK11	AT3G57770	Protein kinase superfamily protein	SDG	Cy (pred)	
PKU12/ ABC1K9	AT5G05200	Protein kinase superfamily protein	SDG und SEC (F74+75)	PL (MS)	(Ytterberg et al., 2006; Lundquist et al., 2012; Lundquist et al., 2013)
PK13	AT5G35380	Protein kinase protein with adenine nucleotide alpha hydrolases-like domain	SDG	ZK (pred)	
PK14/BS K8	AT5G41260	BRASSINOSTEROID-SIGNALING KINASE 8/BSK8 Protein kinase protein with tetratricopeptide repeat domain;	SDG	PM (pred)	(Sreeramulu et al., 2013)
PK15	AT5G43320	casein kinase I-like 8	SDG	Cy (pred)	
PK16/XI P1	AT5G49660	XIP1 XYLEM INTERMIXED WITH PHLOEM 1/Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase family protein;	SDG	PM (pred)	Bryan et al. (2012)
PK17/ (PKU13)	AT3G18680	Amino acid kinase family protein/ uridylate kinase activity, UMP kinase activity/ <i>PK17 wurde im Verlauf der Arbeit in PKU13 umbenannt</i>	DB/CoEx	PL (MS)	
ABC1K1	AT4G31390	ABC1-LIKE KINASE 1	SEC (F74+75)	PL (MS)	(Ytterberg et al., 2006; Lundquist et al., 2012; Lundquist et al., 2013)
ABC1K3	AT1G79600	ABC1-LIKE KINASE 3	SEC (F74+75)	PL (MS)	(Ytterberg et al., 2006; Lundquist et al., 2012; Lundquist et al., 2013)

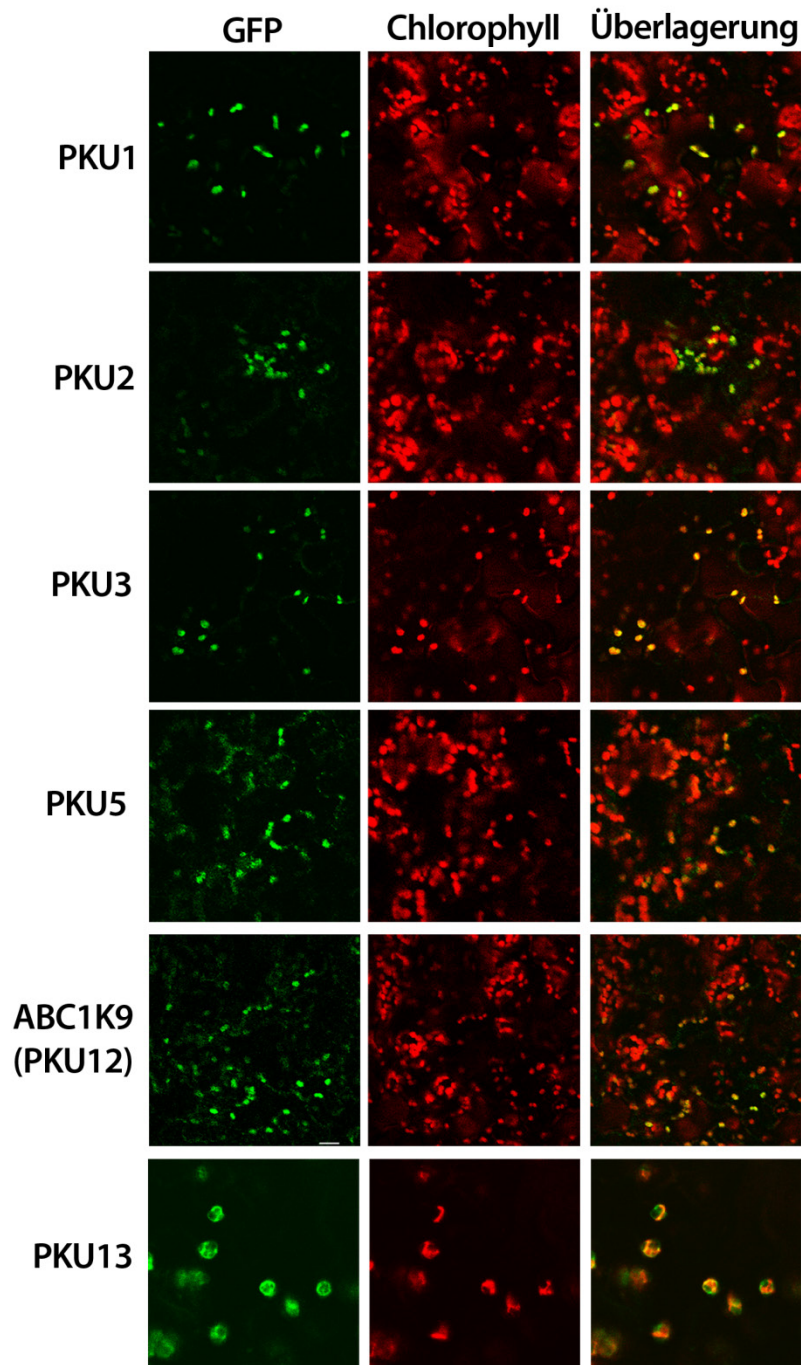
Da die Plastidenlokalisierung der in den Datenbanken gefundenen Kinasen zum Teil nur auf der Vorhersage eines möglichen Transitpeptides basierte und für einzelne dieser PKs widersprüchliche Ergebnisse über die Lokalisierung vorlagen (zum Beispiel PKU1), musste die tatsächliche Lokalisierung experimentell bestätigt werden. Ferner sollte die Lokalisierung, der mittels Fraktionierung von Chloroplasten identifizierten Kinasen, untersucht werden.

### 3.10.6 GFP-Lokalisierungsstudien der identifizierten Proteinkinasen

Um die Lokalisierung der zuvor identifizierten Proteinkinasen (PK) *in planta* zu analysieren wurden die *full length* cDNA-Fragmente dieser in einen Pflanzentransformationsvektor kloniert, welcher die PK mit einem C-terminalen GFP verknüpfte. Mit Ausnahme der PK4 und PK6 war die Klonierung für die oben gezeigten Kinasen erfolgreich. Die *ABC1K1* und *ABC1K3* Fragmente wurden ebenfalls nicht kloniert, da für diese beiden Kinasen eine eindeutige Lokalisierung in den Plastoglobuli der Chloroplasten gezeigt wurde (Ytterberg et al., 2006; Lundquist et al., 2012; Lundquist et al., 2013). Die erzeugten Konstrukte wurden in Tabakblättern transient exprimiert (Agrobakterien-Infiltration) und anschließend die subzelluläre Lokalisation durch Aufnahme des GFP-Signales am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert (Abbildung 3.53). Während die Expression von *PK10*- und *PK13-GFP* zu keiner eindeutigen Detektion von Fluoreszenzsignalen führte, konnten für die PK7 (Plasmamembran), PK11 (Cytosol/Plasmamembran) und PK15 (Cytosol) eine spezifische Lokalisation nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Die in Abbildung 3.53 gezeigten Fluoreszenzsignale für die PKU1, 2, 3, 5, 12 und 13 ließen den Schluss zu, dass jene im Plastiden lokalisiert waren. Das detektierte GFP-Signal überlagerte mit der parallel aufgenommenen Autofluoreszenz der Chloroplasten (Chl) (Abbildung 3.53). Die experimentell ermittelte Lokalisierung bestätigte die zuvor vorhergesagte oder durch massenspektrometrische Analysen gefundene Lokalisation für diese putativen PKs.

Somit konnte für 5 (6 mit der *ABC1K9/PKU12*) der zuvor nicht näher analysierten Kinasen eine eindeutige Lokalisation in den Plastiden nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.53: GFP-Lokalisationsstudie der zuvor identifizierten Proteinkinasen mit putativer Plastidenlokalisation.**

Gezeigt sind nur die Kandidaten für die eine eindeutige Plastidenlokalisierung beobachtet wurde. Die Proteinkinasen wurden in einen Pflanzentransformationsvektor mit C-terminaler GFP Sequenz kloniert und mittels Agrobakterien vermittelter Transformation in Tabakblättern transient exprimiert. Die Aufnahme des GFP-Signals erfolgte 3 Tage nach Infiltration am konfokalen Fluoreszenzmikroskop. PKU= PLASTID PROTEIN KINASE WITH UNKNOWN FUNCTION, Chlorophyll= Autofluoreszenz der Chlorophyllmoleküle. Der Nachweis der Lokalisierung für PKU2 und 12 erfolgte im Rahmen des Projektmoduls von H. Gartmann und wurde zusammen mit den Ergebnissen der anderen PKUs in Richter et al. (2016a) veröffentlicht.

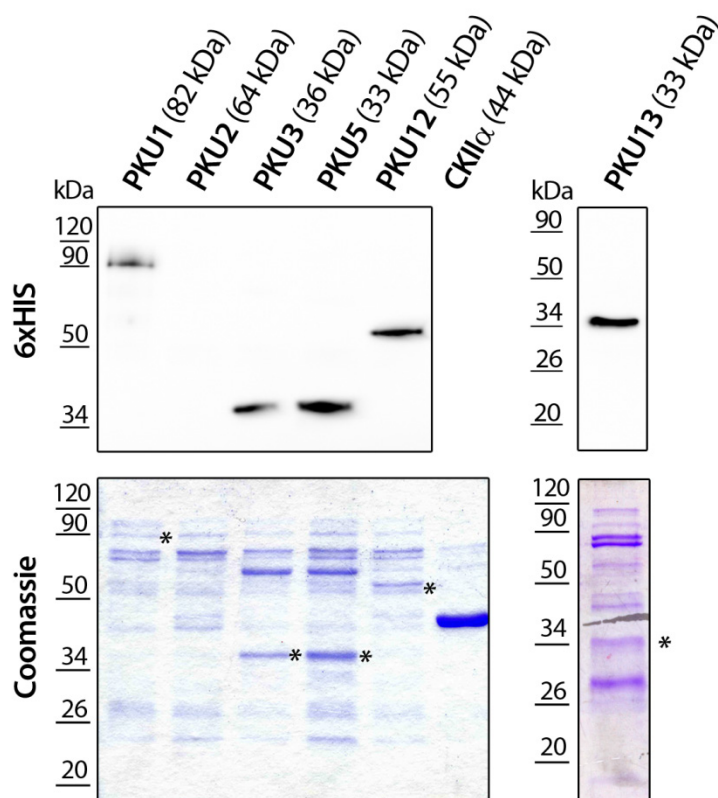
### **3.10.7 Untersuchung der *in vitro* Phosphorylierung von GUN4 durch die identifizierten PLASTID PROTEIN KINASES WITH UNKNOWN FUNCTION (PKU) und die plastidäre CASEIN KINASE II (CKII)**

Die plastidenlokalisierten Kinasen PKU12 und 13 (Tabelle XIX) wurden im Rahmen von Experimenten als mögliche GUN4-Kinasen identifiziert. Ferner konnten die PKU1, 2, 3 und 5 als neue plastidenlokalisierte putative Proteinkinasen ermittelt werden. Daher folgten *in vitro* Analysen, welche die Protein-kinaseaktivität dieser im Allgemeinen und die GUN4-Phosphorylierung im Speziellen untersuchen sollten.

Zusätzlich wurde mit den Experimenten dieses Kapitels die katalytische  $\alpha$ -Untereinheit der plastidären CASEIN KINASE 2 (CKII  $\alpha$ ; Ogrzewalla et al. (2002); Baginsky und Grussem (2009)) hinsichtlich einer möglichen GUN4-Phosphorylierung untersucht. Das Konstrukt und das Expressionsprotokoll für die CKII $\alpha$  wurde von K. Liere (AG Prof. T. Börner, HU Berlin) zur Verfügung gestellt.

### 3.10.7.1 Expression und Aufreinigung der rekombinanten PKUs und CKII $\alpha$

Zunächst wurden die PKUs aus bakteriellen Überexpressionskulturen isoliert. Mit Ausnahme der PKU2 war die Expression und Aufreinigung aus dem löslichen Überstand für die gezeigten PKs erfolgreich. Die PKU2 lag nach der Expression unter verschiedenen Bedingungen ausschließlich als unlösliches Protein (-aggregat) vor (Daten nicht gezeigt). Wenngleich sich der Grad der Reinheit und Anreicherung zwischen den einzelnen PKs unterschied, konnten die rekombinanten Kinasen im coomassiegefärbten SDS-Gel, oder in einer Western-Blot-Analyse mit dem HIS-Tag-Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 3.54).

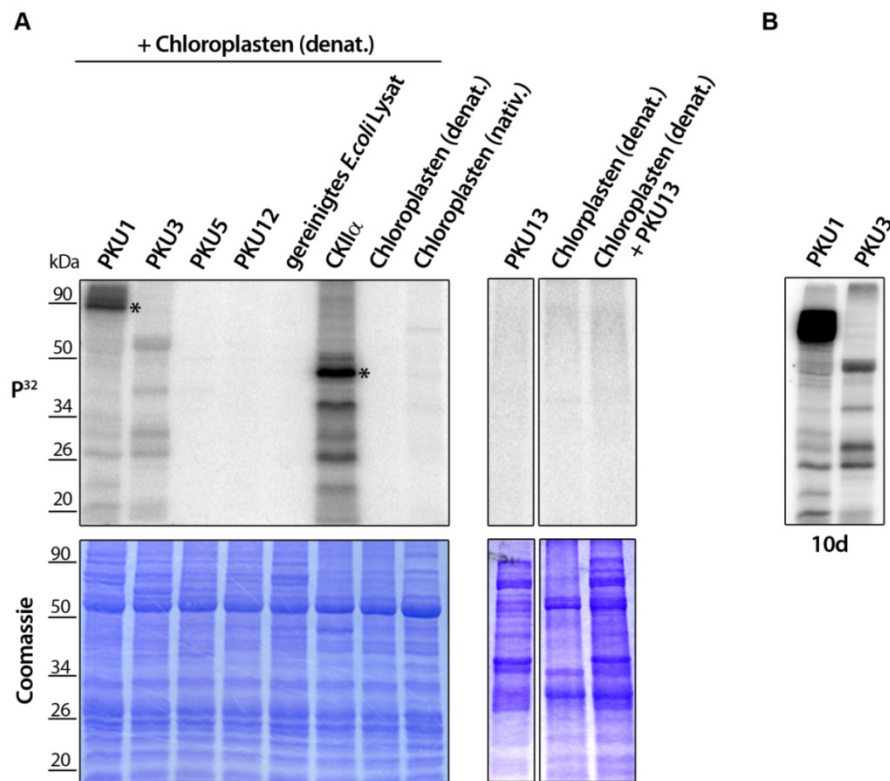


**Abbildung 3.54: Aufreinigung der rekombinanten PKUs aus *E.coli* Überexpressionskulturen.**

Die rekombinanten Kinasen wurden mittels Ni-NTA-Matrix aufgereinigt, dialysiert und ggf. aufkonzentriert. Aliquots jeder Kinasepräparation wurde mit dem 6xHIS-tag spezifischen Antikörper (Western-Blot, 6xHIS, oberes Panel). Die Sterne (\*) zeigen die mit Hilfe des Western-Blot zugeordneten Banden im Coomassie gefärbten Gel (unteres Panel). Die theoretisch errechneten Molekulargewichte der PKUs sind in Klammern angegeben. Als zusätzliche Kontrolle für weitere Analysen wurde die CKII $\alpha$  (Casein Kinase II  $\alpha$  Untereinheit) in das Set aufgenommen. PKU= PLASTID PROTEIN KINASE WITH UNKNOWN FUNCTION. Die Klonierung der PKU-Konstrukte, sowie die Expression und Aufreinigung der PKU1, 2, 3, und 5 erfolgte im Rahmen des Projektmoduls von M. Fechner. Die Arbeiten zur PKU13 wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von A. Kwast durchgeführt. Teile dieser Ergebnisse sind in Richter et al. (2016a) veröffentlicht.

### 3.10.7.2 Aktivitätsnachweis der aufgereinigten Kinasen

Zur Überprüfung einer möglichen Proteinkinaseaktivität der aufgereinigten Kinasen wurden diese in Anwesenheit von radioaktiv markiertem ATP mit denaturierten Col-0 Chloroplastenextrakten, bzw. den enthalten Proteinen als Substrat inkubiert (Kinaseassay). Die Reaktionsansätze wurden anschließend auf einem SDS-Gel aufgetrennt und die radioaktiven Signale detektiert (Abbildung 3.55)



**Abbildung 3.55: Überprüfung der rekombinanten PKUs auf Proteinkinaseaktivität.**

(A) Die aus *E.coli* aufgereinigten Kinasen wurden in Anwesenheit von radioaktiv markiertem ATP und hitzeinaktivierten *Arabidopsis* Col-0 Chloroplastenproteinen (denat.) inkubiert. Das Phosphorylierungssignal (P<sup>32</sup>) (oberes Panel) wurde mit dem Phosphoimager ausgelesen. PKU2 konnte nicht als rekombinantes Protein aufgereinigt werden und wurde daher nicht analysiert. Die Sterne zeigen die Autophosphorylierung von PKU1 und CKIIα (CASEIN KINASE II α Untereinheit). (B) Signale für PKU1 und PKU3 nach 10-tägiger Exposition auf dem Phosphoimager-Screen. PKU= PLASTID PROTEIN KINASE WITH UNKNOWN FUNCTION. Teile dieser Abbildung wurden in Richter et al. (2016a) veröffentlicht.

Im Vergleich zum nativen Chloroplastenextrakt, konnten für den denaturierten Chloroplastenextrakt keine radioaktiven Signale beobachtet werden. Die Hitzeinaktivierung führte zum Verlust der endogenen Proteinkinaseaktivitäten (Abbildung 3.55 A). Da die isolierten Kinasen zum Teil mit Proteinen aus *E.coli* verunreinigt waren, wurde der denaturierte Plastidenextrakt als zusätzliche Kontrolle mit einem partiell gereinigten *E.coli*-Lysat inkubiert. Auch hier konnte keine Phosphorylierung der angebotenen *At* Proteine detektiert werden (Abbildung 3.55 A).

Die Anwesenheit von rekombinanter PKU1 und 3 sowie der CKIIα führte, im Gegensatz zu den Negativkontrollen, zu einer Übertragung von markierten Phosphatgruppen auf die angebotenen

Plastidenproteine. Für die PKU1 und CKII $\alpha$  wurde eine Autophosphorylierung der Kinasen beobachtet (Abbildung 3.55 A). Nach einer längeren Expositionszeit mit dem Phosphoimager-Screen zeigten sich neben gemeinsamen auch Signale, welche spezifisch für die PKU1 oder 3 waren (Abbildung 3.55 B). Die getesteten PKU5, 12 und 13 wiesen unter den hier gewählten Assaybedingungen keine Proteinkinaseaktivität auf (Abbildung 3.55 A). In einem zukünftigen Experiment sollte zusätzlich der Aktivitätsnachweis von PKU5, 12, 13 gegen native Chloroplastenextrakte erfolgen.

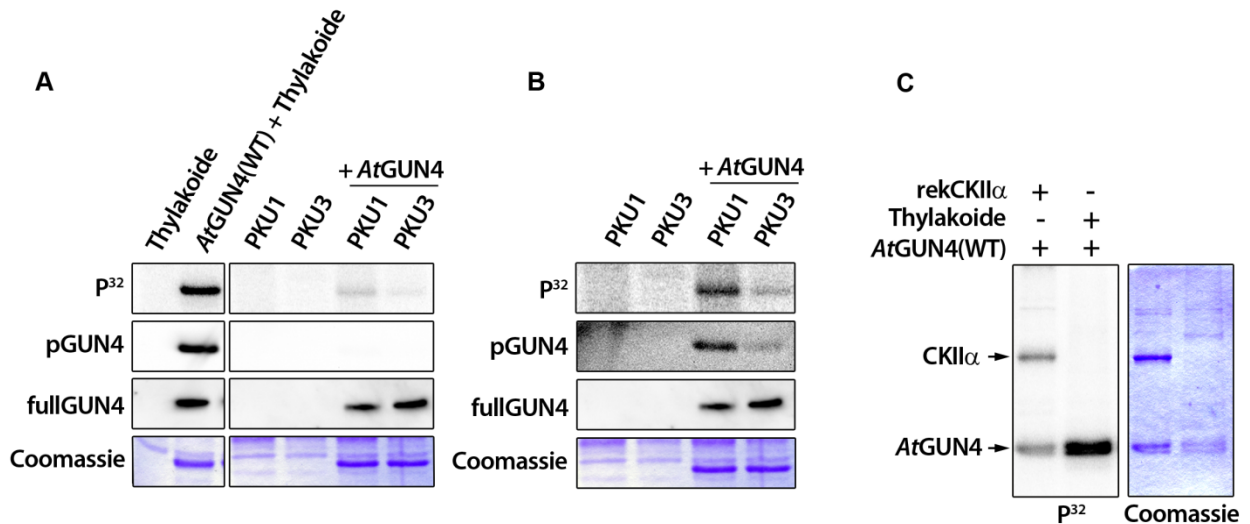
In der Zusammenfassung zeigte die rekombinante PKU12/ABC1K9, welche in den Fraktionen der SEC und SDG mit GUK-Aktivität identifiziert wurde, keine Proteinkinaseaktivität. Auch für die mit GUN4 co-exprimierte PKU13 konnte keine Proteinkinaseaktivität festgestellt werden. Dennoch kann festgehalten werden, dass 2 der zuvor identifizierten plastidenlokalisierten Kinasen eine Proteinkinaseaktivität aufwiesen und somit der Nachweis der *in vitro* Proteinkinaseaktivität für die plastidären PKU1 und 3 erbracht wurde.

### 3.10.7.3 GUN4-Kinaseassay mit rekombinanten PKU1, PKU3 und CKII $\alpha$

Für die PKU1 und PKU3, sowie CKII $\alpha$  wurde eine *in vitro* Proteinkinaseaktivität nachgewiesen. Daher wurden diese anschließend auf die Möglichkeit der GUN4-Phosphorylierung analysiert. Hierfür wurden das rekombinante GUN4 mit einem Aliquot der PKUs/CKII $\alpha$  inkubiert. Um den Grad einer möglichen Phosphorylierung durch die rekombinanten Kinasen abschätzen zu können, wurde das GUN4 zusätzlich mit einem Thylakoid-Extrakt von *At* Pflanzen inkubiert („normaler“ Kinaseassay). Im Vergleich zu den aufgereinigten Kinasen enthielt dieser zwangsläufig quantitativ weniger GUK. Beim Vorliegen einer spezifischen Phosphorylierung des GUN4 durch eine der rekombinanten Kinasen, sollte das beobachtete Signal folglich wesentlich stärker im Vergleich zur Phosphorylierung durch den Thylakoid-Extrakt sein (aufge reinigte spezifische Kinase sollte zu mehr Phosphorylierungssignal führen).

Die in Abbildung 3.56 gezeigte Analyse ergab das folgende, hochinteressante Ergebnis: alle analysierten Kinasen waren in der Lage einen Phosphatrest auf das AtGUN4 zu übertragen. Sowohl Anwesenheit rekombinanter PKU1, als auch PKU3 führte zu einer detektierbaren Phosphorylierung des GUN4-Proteins. Die Phosphorylierung konnte sowohl im Autoradiogramm, als auch mit dem pGUN4 Antikörper nachgewiesen werden. Dieser Befund war ein Hinweis auf die Übertragung eines Phosphatrestes auf die GUN4-Phosphorylierungsstelle S264 durch PKU1 und 3 (nur diese wird durch den pGUN4 Antikörper erkannt) (Abbildung 3.56 A und B). Auch die Anwesenheit der rekombinanten CKII $\alpha$  führte zu einer deutlichen Phosphorylierung von GUN4 (Abbildung 3.56 C). Vergleicht man die detektierten Signalstärken für das phosphorylierte GUN4 nach der Inkubation mit den rekombinanten Kinasen mit dem Signal nach der Inkubation mit Thylakoidextrakten, zeigte sich ein

quantitativer Unterschied. Es wurde eine vielfach stärkere Phosphorylierung von GUN4 durch die Thylakoidextrakte, als durch die rekombinanten Kinasen beobachtet (Abbildung 3.56 A und C). So wurden für die Ansätze mit PKU1 und 3 sehr schwache Signale (Autoradiogramm und pGUN4) im Vergleich zur Kontrolle (Thylakoide+GUN4) detektiert (Abbildung 3.56 A), welche erst nach einer von der Kontrolle unabhängiger Kontrastanpassung deutlich sichtbar wurden (Abbildung 3.56 B). Das gleiche Bild ergab sich für die Inkubation von GUN4 mit der CKII $\alpha$  (Abbildung 3.56 C).



**Abbildung 3.56: Überprüfung der Phosphorylierung von rekombinantem *Arabidopsis* (At)GUN4(WT) durch die PKUs und CKII $\alpha$ .**

(A) und (B) PKU1, PKU3 und (C) CKII $\alpha$ . Die Kinaseassays wurden in Anwesenheit von radioaktiv markiertem ATP durchgeführt. Aliquots der Kinaseassays wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und mittels Phosphorimager-Screen ( $P^{32}$ ) sowie Western-Blot (pGUN4 und fullGUN4-Antikörper) analysiert. (A) Kinaseassay mit PKU1 und 3. Als Kontrolle wurde das rekombinante AtGUN4 mit Col-0 Thylakoidextrakten inkubiert. Alle Proben wurden auf demselben Gel analysiert und das Ergebnis nachträglich beschnitten, ohne die Signalverhältnisse zu verändern. (B) Signale aus (A) mit angepasstem Kontrast. (C) Kinaseassay mit rekombinanter CKII $\alpha$  (Casein Kinase II  $\alpha$  Untereinheit) und AtGUN4(WT). Als Kontrolle wurde das rekombinante AtGUN4 mit Col-0 Thylakoidextrakten inkubiert. Die Coomassiefärbungen zeigen das rekombinante GUN4. Die analysierten rekombinanten Kinasen konnten AtGUN4(WT) phosphorylieren. Die Stärke der Phosphorylierung war jedoch um ein Vielfaches geringer als die Phosphorylierung durch Thylakoidextrakte. PKU= PLASTID PROTEIN KINASE WITH UNKNOWN FUNCTION.

Damit kann festgehalten werden, dass das Überangebot einer rekombinanten Kinase in einem *in vitro* Kinaseassay zwar zu einer Phosphorylierung des GUN4 führte. Jedoch zeigte sich, dass die hier analysierten Kinasen (PKU1, 3 und CKII $\alpha$ ) höchstwahrscheinlich nicht die GUK sind.



### 3.10.8 Isolation von Mutanten für die identifizierten PKUs

Lediglich für die PKU1 und 3 konnte eine *in vitro* Proteinkinaseaktivität nachgewiesen. Die GUN4-Kinaseassays mit diesen Kinasen ließen jedoch keine eindeutigen Rückschlüsse zu. Dennoch wurden die PKU12/ABC1K9, PKU13 oder die ABC1K1 und ABC1K3 als mögliche GUK Kandidaten identifiziert. Daher sollte ein Kinaseassay mit Extrakten von Mutantenlinien dieser Kinasen durchgeführt werden. Es wurde angenommen, dass der *knockout/knockdown* einer dieser Kinasen zu einer Veränderung der GUN4-Phosphorylierung durch die Mutantenextrakte führen müsste.

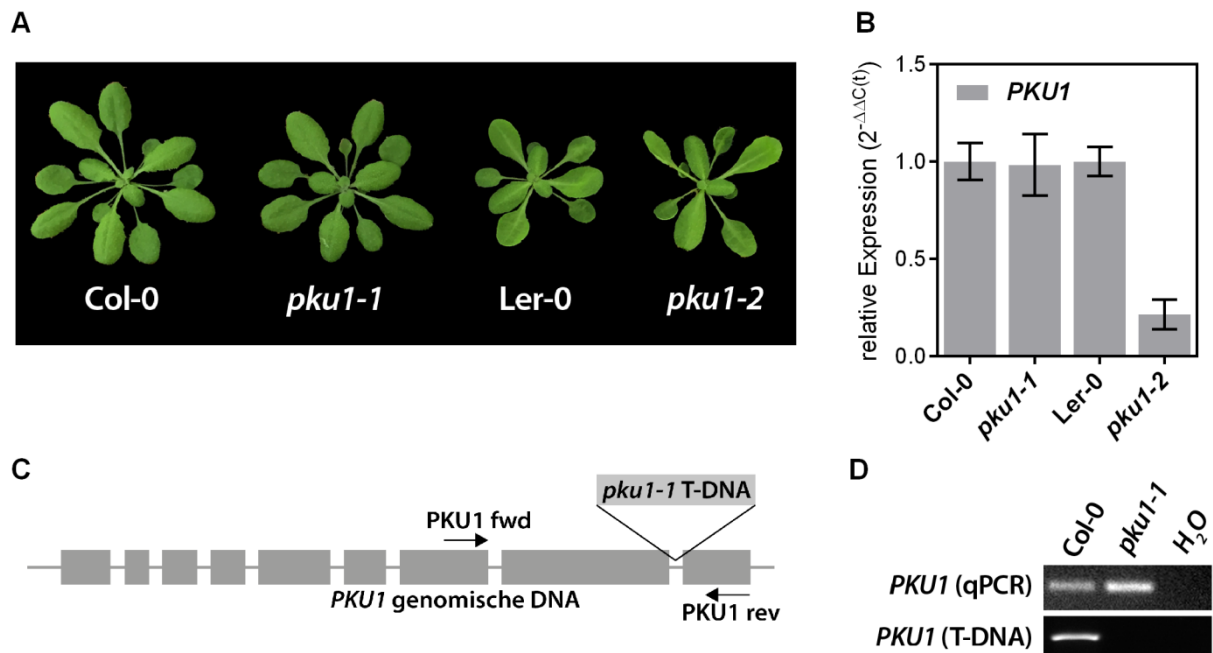
Für die Mutanten von ABC1K1 und ABC1K3 wurde das Saatgut von K. v. Wijk (Cornell Universität, Ithaca, US) bereitgestellt. Für die PKU13 konnte im Rahmen der Bachelorarbeit von A. Kwast keine Linie mit reduzierten Transkriptgehalten isoliert werden.

Unter meiner Mitarbeit und Ko-Betreuung des Studenten H. Gartmann wurden für die verbleibenden PKUs (1,2,3,5,12) homozygote T-DNA Insertionslinien isoliert.

In den folgenden Kapiteln soll ein kurzer Einblick in die wesentlichen Charakteristika der entsprechenden Mutantenlinien gegeben werden. Dabei wird nur auf die Mutantenlinien mit einer Veränderung des Transkriptgehaltes eingegangen.

### 3.10.8.1 Isolation von *pku1* Mutanten

Für die PKU1 konnten zwei Linien - *pku1-1* und *pku1-2* - isoliert werden. Während die *pku1-2* im Vergleich zum WT (Ler-0) eine *knockdown* Linie war (20% WT-Transkript), hatte die T-DNA Insertion in der *pku1-1* Linie keinen Einfluss auf die Akkumulation der PKU1 mRNA (Abbildung 3.57 A und B). Jedoch zeigte sich, dass die in der *pku1-1* Linie gebildete mRNA eine verkürzte Variante der PKU1 kodierten müsste. Das PKU1 Transkript konnte mit der Primerkombination „T-DNA“ (Primer vor und nach der T-DNA-Insertionsstelle) nicht amplifiziert werden (Abbildung 3.57 D). Dies bedeutet, dass sie im 3'-Bereich der kodierenden Sequenz gelegene T-DNA (Abbildung 3.57 C) die Verkürzung des PKU1-1 Transkripts bewirkt. Unabhängig vom Genotyp zeigten die beiden *pku1* Linien einen WT-artigen Phänotyp (Abbildung 3.57 A).

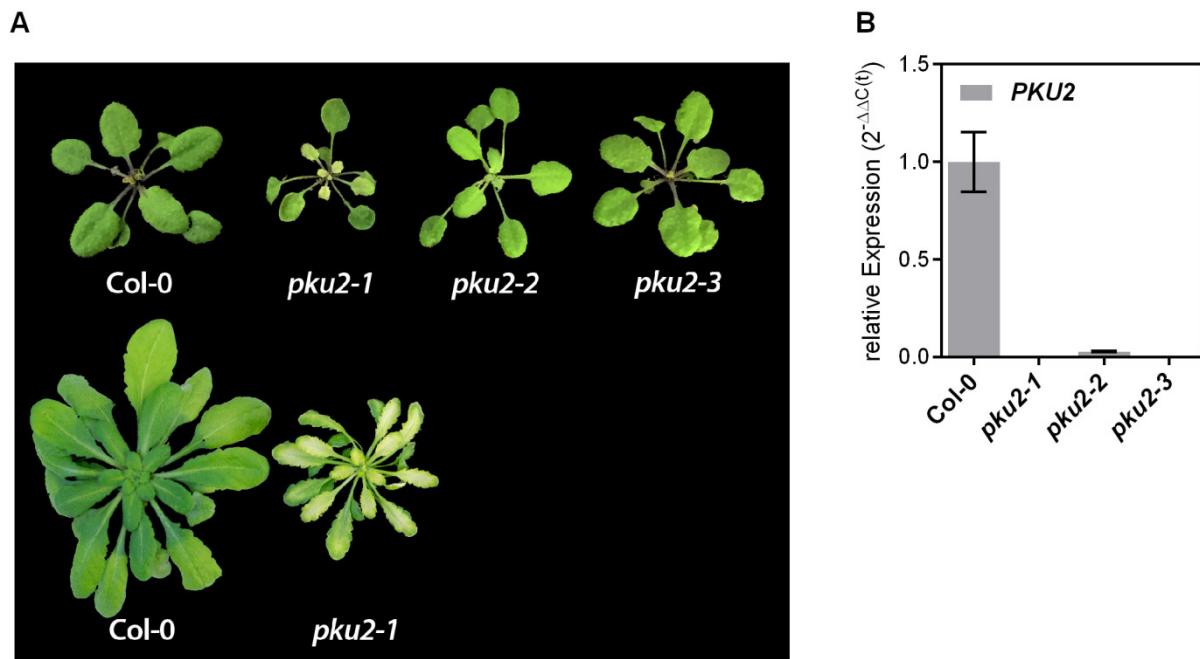


**Abbildung 3.57: Analyse von T-DNA Insertionsmutanten von PKU1.**

(A) Phänotyp von *pku1-1* (WiscDsLoxHs043\_12B) und *pku1-2* (CSHL\_GT8369 / Ler-0 Hintergrund) angezogen für 4-5 Wochen im Kurztag bei 80-100  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . (B) Quantifizierung des PKU1 Transkripts in den Genotypen relativ zur WT Kontrolle. Die Berechnung der Expression erfolgte relativ zur WT-Kontrolle (*Col-0*) und den Referenzgenen *SAND* und *PEX4* ( $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ ). Daten sind gezeigt als Mittelwert  $\pm$  SEM, n=3 (C) Schematische Darstellung des genomischen Fragmentes von PKU1. Die T-DNA Insertion (letztes Intron) der *pku1-1* Linie ist hervorgehoben. (D) PCR-Analyse des cDNA-Fragmentes für PKU1 umgeschrieben aus *Col-0* und *pku1-1* mRNA. Die Primerkombination „qPCR“ amplifizierte ein Fragment vor der T-DNA Insertionsstelle. Die Primerkombination „T-DNA“ überspannte die T-DNA Insertionsstelle (siehe (C) Primer „PKU1 fwd“ und „PKU1 rev“). Die *pku1-1* Linie wies WT-artige PKU1 Level auf. Das PKU1 Transkript war jedoch verkürzt. *pku1-2* war eine *knock down* Linie. PKU= PLASTID PROTEIN KINASE WITH UNKNOWN FUNCTION. Die hier gezeigten Daten wurden teilweise im Rahmen der Masterarbeit von H. Gartmann erzeugt.

### 3.10.8.2 Isolation von *pku2* Mutanten

Aus den öffentlichen Samenbanken für *At* Mutanten konnten drei Linien mit T-DNA Insertion im *PKU2* Gen isoliert werden (Abbildung 3.58). Die isolierten Linien, *pku2-1*, *pku2-2* und *pku2-3*, wiesen eine starke Reduktion der *PKU2* mRNA auf. Im Vergleich zum WT wurden Transkriptgehalte unter 5% des WT-Wertes detektiert (Abbildung 3.58 B).



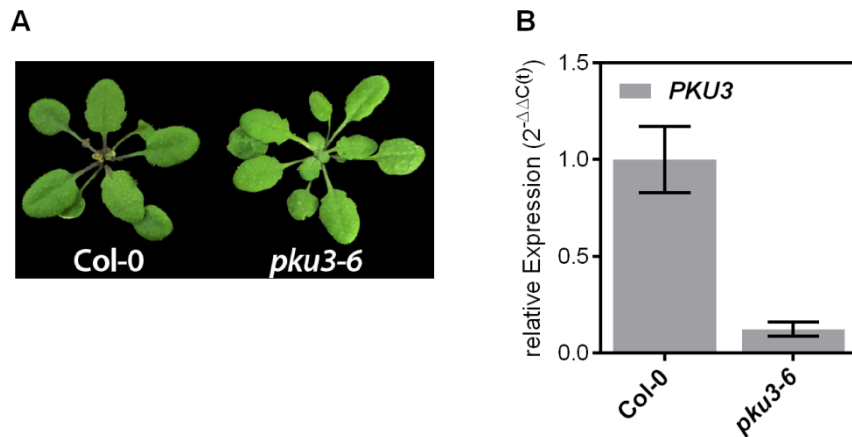
**Abbildung 3.58: Analyse von T-DNA Insertionsmutanten von *PKU2*.**

(A) Phänotyp von *pku2-1* (SALK\_004748C), *pku2-2* (SALK\_070579C) und *pku2-3* (WiscDsLox497\_10B), angezogen für 3 Wochen im Kurztag bei 80-100  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Im unteren Bereich ist die deutliche Wachstumsverzögerung und der bleiche Phänotyp der *pku2-1* Linie nach 8 Wochen Wachstum im Kurztag sichtbar. (B) Quantifizierung des *PKU2* Transkriptes in den Genotypen relativ zur WT Kontrolle. Die Berechnung der Expression erfolgte relativ zur WT-Kontrolle (Col-0) und den Referenzgenen *SAND* und *PEX4* (2<sup>-ΔΔC(t)</sup>). Daten sind gezeigt als Mittelwert  $\pm$  SEM, n=3. PKU= PLASTID PROTEIN KINASE WITH UNKNOWN FUNCTION. Die hier gezeigten Daten wurden teilweise im Rahmen der Masterarbeit von H. Gartmann erzeugt.

Im Vergleich zum WT und den zwei anderen *pku2* Linien zeigte die *pku2-1* Linie einen veränderten Phänotyp. Unter Standardwachstumsbedingungen war diese Linie durch eine deutliche Chlorose der Blätter, begleitet von einer starken Wachstumsverzögerung, im Vergleich zum WT charakterisiert (Abbildung 3.58 A). Die ausgebleichten Blätter der *pku2-1* Pflanzen waren bereits nach wenigen Tagen der Anzucht sichtbar. Der chlorotische Phänotyp und die Wachstumsverzögerung nahmen mit längerer Anzucht zu (Abbildung 3.58 A). Ein Großteil der homozygoten *pku2-1* Pflanzen starb jedoch kurz nach der Keimung auf Erde. Wenngleich dieser drastische Phänotyp sehr interessant war, zeigte der Vergleich mit den anderen *pku2* Linien, dass vermutlich nicht der *knockout/ knockdown* der *PKU2* für den *pku2-1* Phänotyp verantwortlich war. Es wurde vermutet, dass eine zweite T-DNA Insertion in der *pku2-1* für den beobachteten Wachstumsphänotyp verantwortlich war.

### 3.10.8.3 Isolation von *pku3* Mutanten

Für die *PKU3* konnte eine homozygote *knockdown* Linie isoliert werden. Die *pku3-6* zeigte einen WT-artigen Phänotyp (Abbildung 3.59 B) bei einer 90%igen Reduktion des *PKU3* Transkriptes (Abbildung 3.59 B).

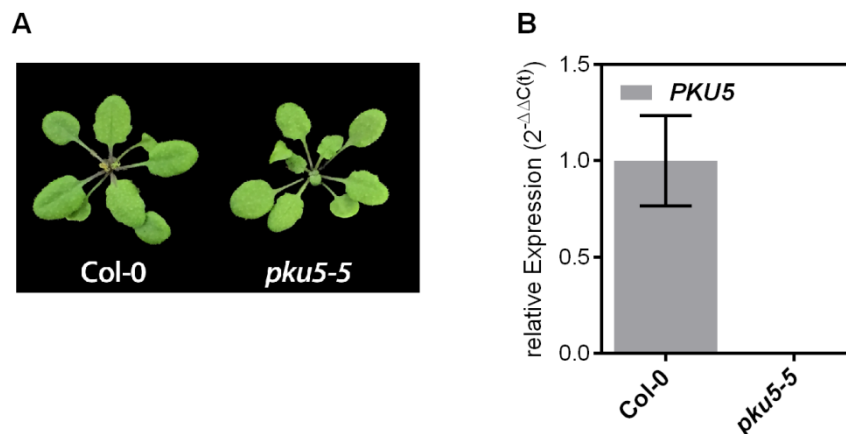


**Abbildung 3.59: Analyse von T-DNA Insertionsmutanten von *PKU3*.**

(A) Phänotyp von *pku3-6* (SALK\_030551) angezogen für 3 Wochen im Kurztag bei 80-100  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . (B) Quantifizierung des *PKU3* Transkriptes in den Genotypen relativ zur WT Kontrolle. Die Berechnung der Expression erfolgte relativ zur WT-Kontrolle (Col-0) und den Referenzgenen *SAND* und *PEX4* ( $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ ). Daten sind gezeigt als Mittelwert  $\pm$ SEM, n=3. PKU= PLASTID PROTEIN KINASE WITH UNKNOWN FUNCTION. Die hier gezeigten Daten wurden teilweise im Rahmen der Masterarbeit von H. Gartmann erzeugt.

#### 3.10.8.4 Isolation von *pku5* Mutanten

Auch für die PKU5 konnte eine T-DNA Insertionslinie mit veränderter *PKU5* Expression identifiziert werden. Der *knockout* des *PKU5* Gens (Abbildung 3.60 B) führte zu keiner makroskopischen Veränderung der *pku5-5* Pflanzen (Abbildung 3.60 A).



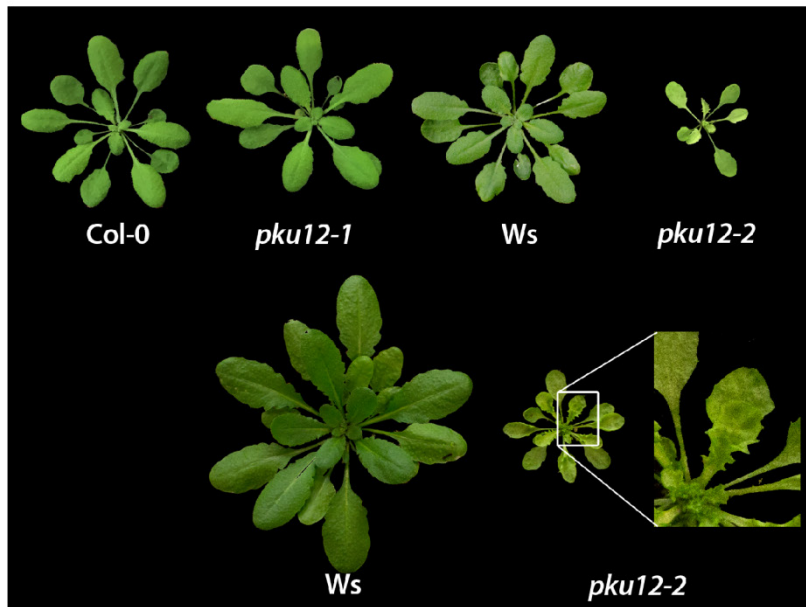
**Abbildung 3.60: Analyse von T-DNA Insertionsmutanten von *PKU5*.**

(A) Phänotyp von *pku5-5* (GABI\_684D04) angezogen für 3 Wochen im Kurztag bei 80-100  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . (B) Quantifizierung des *PKU5* Transkriptes in den Genotypen relativ zur WT Kontrolle. Die Berechnung der Expression erfolgte relativ zur WT-Kontrolle (Col-0) und den Referenzgenen *SAND* und *PEX4* ( $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ ). Daten sind gezeigt als Mittelwert  $\pm$ SEM, n=3. PKU= PLASTID PROTEIN KINASE WITH UNKNOWN FUNCTION. Die hier gezeigten Daten wurden teilweise im Rahmen der Masterarbeit von H. Gartmann erzeugt.

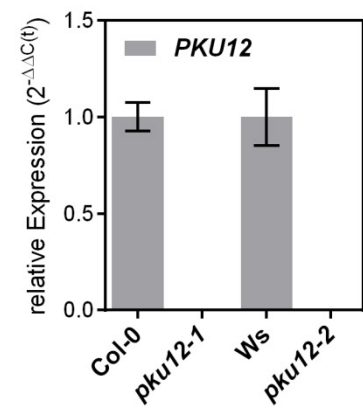
#### 3.10.8.5 Isolation von *pku12* Mutanten

Als eine der vielversprechendsten Kandidaten für die GUK wurde die PKU12 identifiziert. Für *PKU12/ABC1K9* wurden zwei *knockout* Linien mit unterschiedlichen Phänotypen isoliert (Abbildung 3.61 A). Während die *pku12-1* einen WT-artigen Phänotyp aufwies, zeigte die *pku12-2* einen chlorotischen Blattphänotyp und verzögerten Wuchs (Abbildung 3.61 A). Im Verlauf der Entwicklung der Pflanzen zeigte diese Linie zusätzlich eine Veränderung der Blattmorphologie. Im Vergleich zum entsprechenden WT (Ws) entwickelten die *pku12-2* Pflanzen stark gezackte Rosettenblätter. Die Analyse der *PKU12* mRNA-Gehalte in *pku12-1* und *pku12-2* (Abbildung 3.61 B) ließen jedoch den Schluss zu, dass nicht der *knockout* des *PKU12* Transkriptes für die veränderte Blattmorphologie der *pku12-2* Linie verantwortlich war. Vielmehr schien es wahrscheinlich, dass eine zweite T-DNA Insertion in einem weiteren Gen ursächlich für den beobachteten Wachstumsphänotyp war.

A



B

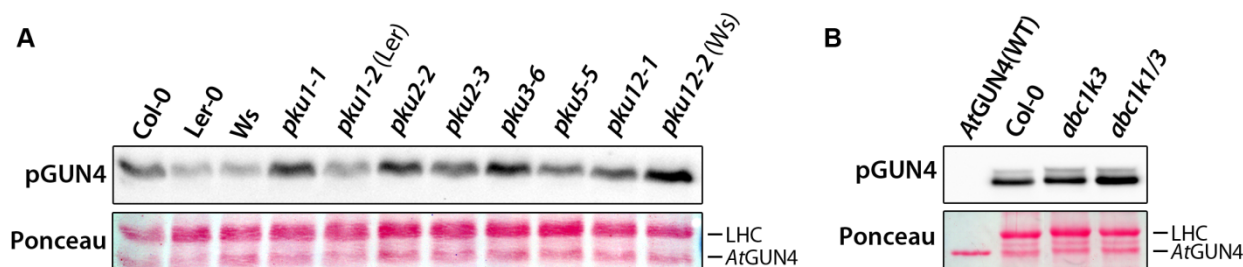


**Abbildung 3.61: Analyse von T-DNA Insertionsmutanten von *PKU12*.**

(A) Phänotyp von *pku12-1* (SALK\_201431C) und *pku12-2* (EBN37 (FLAG\_243F12 + FLAG\_244C08 / Wassilewskija (Ws) Hintergrund) angezogen für 4-5 Wochen im Kurztag bei  $80-100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Im unteren Bereich ist die deutliche Wachstumsverzögerung, sowie der bleiche und gezackte Blattphänotyp der *pku12-2* Linie nach 8 Wochen Wachstum im Kurztag sichtbar. (B) Quantifizierung des *PKU12* Transkriptes in den Genotypen relativ zur WT Kontrolle. Die Berechnung der Expression erfolgte relativ zur WT-Kontrolle (Col-0) und den Referenzgenen *SAND* und *PEX4* ( $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ ). Daten sind gezeigt als Mittelwert  $\pm$ SEM,  $n=3$ . Beide Linien sind *knockout* Linien für *PKU12*. PKU= PLASTID PROTEIN KINASE WITH UNKNOWN FUNCTION. Die hier gezeigten Daten wurden teilweise im Rahmen der Masterarbeit von H. Gartmann erzeugt.

### 3.10.9 Kinaseassay mit Extrakten von *pku* und *abc1k* Mutanten

Mit den zuvor isolierten Mutantenlinien für die PKUs konnte anschließend ein GUN4-Kinaseassay durchgeführt werden. Da die *pku2-1* Linie eine sehr starke Wachstumsverzögerung aufwies und sich nur wenige Pflanzen bei Anzucht auf Erde über das 4-Blattstadium hinaus entwickelten, wurde diese Linie nicht analysiert. Zusätzlich zu den *pku* Linien wurden hier die *knockout* Mutanten *abc1k3* und *abc1k1/abc1k3* analysiert.



**Abbildung 3.62: GUN4-Kinaseassay mit Extrakten von Mutanten neu identifizierter und bekannter plastidenlokalisierter Proteinkinasen.**

(A) Kinaseassay mit Mutanten der zuvor identifizierten PLASTID PROTEIN KINASE WITH UNKNOWN FUNCTION 1, 2, 3, 5 und 12 (*pku*). In Klammern ist der abweichende WT-Hintergrund angegeben. (B) Kinaseassay mit Mutanten von ACTIVITY OF BC1 COMPLEX KINASE 3 (*abc1k3*) und einer Doppelmutante von ABC1K3 und ABC1K1 (*abc1k1/abc1k3*). Das Phosphorylierungssignal wurde mit dem phosphorylierungsspezifischen pGUN4-Antikörper nachgewiesen. Der *one leaf* Kinaseassay wurde *nicht* in eine lösliche und Pelletfraktion getrennt. Die Position des rekombinanten AtGUN4(WT) und der LHC-Proteine (Kontrolle für den Einsatz gleicher Mengen von Extrakten) ist angegeben. Alle untersuchten Genotypen zeigten mindestens eine WT-artige Phosphorylierung des angebotenen AtGUN4.

Extrakte von *pku1-1* und *pku1-2* Mutanten zeigten dieselbe Phosphorylierung wie die korrespondierenden WT-Extrakte. Ein ähnliches Bild ergab sich für die analysierten *pku2-2*, *pku2-3*, *pku3-6*, *pku5-5* und *pku12-1* Linien. Lediglich der Extrakt der *pku12-2* Linie führte zu einer leicht erhöhten Phosphorylierung des rekombinanten GUN4 (Abbildung 3.62 A). Da die *pku12-2* eine *knockout* Linie für *PKU12* war, war anzunehmen, dass diese Erhöhung vielmehr mit dem stark chlorotischen und wachstumsverzögerten Phänotyp der *pku12-2* Linie im Vergleich zum WT erklärt werden konnte (Abbildung 3.61 A).

Auch die *knockout* Linien der *ABC1K1* und 3 Kinasen zeigten eine WT-gleiche Phosphorylierung des angebotenen GUN4 (Abbildung 3.62 B).

### **3.10.10 Zusammenfassung zur Identifizierung der GUK**

Mit Blick auf die in diesem Kapitel durchgeführten Experimente lassen sich folgende Aussagen zusammenfassen. Die durchgeführten biochemischen und physikalischen Trennmethode wurden erfolgreich zur Anreicherung von Chloroplastenfraktionen mit GUK-Aktivität eingesetzt. Die anschließende massenspektrometrische Analyse dieser Fraktionen ergab ein kleines Set putativer GUK. Zusammen mit den in den Datenbanken identifizierten putativen Proteinkinasen und anschließender GFP-Lokalisierungsstudie konnte das neue Set der PLASTID PROTEIN KINASE WITH UNKNOWN FUNCTION (PKU) definiert werden. Zwei dieser PKUs zeigten eine Proteinkinaseaktivität *in vitro*.

Die *in vitro* und *in vivo* Analyse der GUK Kandidaten, insbesondere von PKU12/ABC1K9 oder ABC1K1 und 3, führte jedoch nicht zur Identifizierung der GUK, sodass die Identität der GUK bis zum Abschluss der Experimente der vorliegenden Arbeit ungeklärt blieb.



### 3.11 Untersuchung einer zusätzlichen GUN4-Modifikation

Als essentieller Stimulator der lichtabhängigen TBS wird die *GUN4* Expression durch Lichtsignale gesteuert. Die zuvor veröffentlichten Analysen und die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente zeigten, dass das GUN4-Protein im Rahmen von Western-Blot-Analysen in drei immunoreaktiven Banden in einem Extrakt von *At* Pflanzen akkumulierte. Wenngleich die publizierten Ergebnisse keine wesentlichen Unterschiede in der relativen Akkumulation der drei GUN4-Banden unter verschiedensten Wachstumsbedingungen zeigten, wurde vermutet, dass es einen funktionellen Zusammenhang zwischen der Funktion des GUN4 und dem Auftreten der drei immunoreaktiven GUN4-Banden gibt (Larkin et al., 2003; Peter und Grimm, 2009).

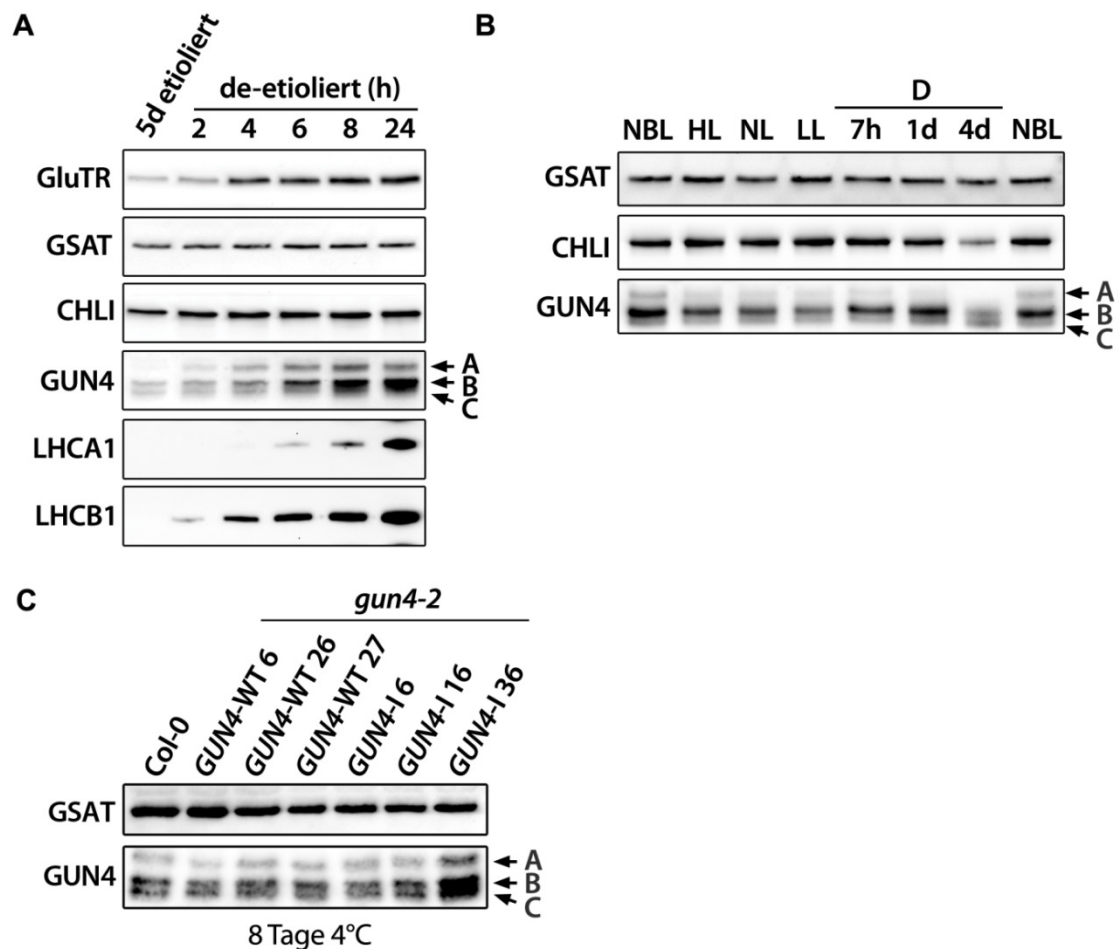
Daher sollte dieser Zusammenhang mit den im Folgenden gezeigten Experimenten näher untersucht werden. Ferner wurde festgestellt, dass das rekombinante GUN4-Protein nach einem Kinaseassay ebenfalls in drei verschiedenen Formen vorlag (Vergleich Abschnitt 3.1.3 - Abbildung 3.3, S.123). Unter zur Hilfenahme des Kinaseassay wurde eine biochemische Strategie entwickelt, die es erlaubte die unterschiedlichen GUN4-Spezies anzureichern und per Massenspektrometrie zu analysieren, um somit einen Hinweis auf die vorliegenden Modifikation(en), die zu den verschiedenen GUN4-Spezies führten, zu erhalten.

An dieser Stelle ist der Hinweis wichtig, dass die beobachtete Modifikation und das Auftreten der GUN4-Banden unabhängig von der Phosphorylierung des GUN4 waren. Diese Veränderungen am GUN4 wurden innerhalb der vorliegenden Arbeiten parallel analysiert (Vergleich Abschnitt 3.2, S.133 und Abschnitt 3.3 S.139). Daher wird im Folgenden der Term „zusätzliche“ Modifikation genutzt, wenngleich dies keine Bewertung hinsichtlich der Wichtigkeit dieser Modifikation in Bezug auf die GUN4-Funktion darstellen soll.

#### 3.11.1 Veränderung des GUN4-Bandenmusters unter variierenden

##### Wachstumsbedingungen

Um Hinweise auf die Funktion(en) der GUN4-Spezies zu erhalten, wurde der Versuch unternommen, Wachstumsbedingungen zu identifizieren, in denen sich das GUN4-Bandenmuster in einem WT-Proteinextrakt veränderte. Hierfür wurden *At* Pflanzen für 5 Tage etioliert und anschließend für unterschiedliche Zeiträume im Licht inkubiert. Zusätzlich sollte der Einfluss unterschiedlicher Lichtbedingungen und Anzuchttemperaturen auf das Auftreten der GUN4-Spezies analysiert werden (Abbildung 3.63).



**Abbildung 3.63: Untersuchung des GUN4-Bandenmuster in unterschiedlichen Wachstumsbedingungen.**

(A) Western-Blot-Analyse einer De-etiolierungskinetik von *Arabidopsis* Pflanzen. Die Pflanzen wurden in Sterilkultur auf MS-Platten für 5d etioliert und anschließend für die angegebenen Zeitpunkte im Licht inkubiert. (B) *Arabidopsis* Col-0 Pflanzen (14-Tage alt) wurden 4h nach Belichtungsbeginn (NBL) für 7h in Hochlicht (HL; 600  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), Normallicht (NL; 120  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), Schwachlicht (LL; 20  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) oder Dunkelheit (D) inkubiert. Die Dunkelinkubation wurde für 1, bzw. 4 Tage fortgesetzt. (C) Analyse des GUN4-Bandenmuster in unterschiedlichen Genotypen nach 8 Tagen Kältestress (4°C, Kurztag, 100  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Der Wechsel zu 4°C erfolgte nach 14-tägigem Wachstum der Pflanzen bei 22°C. Die hier gezeigten Daten wurden teilweise im Rahmen der Bachelorarbeit von A. Kwast erzeugt (A und B).

Sowohl die GluTR und GSAT als auch CHLI und GUN4 wurden in Extrakten von *At* Col-0 Pflanzen nach 5-tägiger Etiolierung detektiert (Abbildung 3.63 A). Die LHCA1/B1 Proteine konnten nach der Anzucht in der Dunkelheit nicht nachgewiesen werden. Mit dem Übergang in das Licht stieg die Menge an GluTR und GUN4 an. Die Gehalte für GSAT und CHLI veränderten sich im Vergleich zur vorhergehenden Dunkelphase nur geringfügig. Nach zwei bzw. sechsstündiger Lichtinkubation wurden ebenfalls die LHCA und LHCB-Proteine detektiert (Abbildung 3.63 A). Parallel zur Akkumulation der LHC-Proteine wurde eine Zunahme der Chl-Gehalte in den de-etilierenden Pflanzen beobachtet (Daten nicht gezeigt). Neben den Unterschieden in der Gesamtmenge der untersuchten Proteine wurde für das GUN4 ein quantitativer Unterschied in den detektierten GUN4-Banden beobachtet. In vollständig ergrüneten *At* Pflanzen (24h de-etioliert) konnten die drei zuvor erwähnten immunoreaktiven GUN4-Spezies detektiert werden (Abbildung 3.63 A). Diese als Bande A,

B und C bezeichneten Spezies lagen dabei im Licht im folgenden Verhältnis vor: das Auftreten der Hauptform des GUN4 im Licht (Bande B) wurde begleitet durch eine in geringeren Mengen vorliegende GUN4-Form. Diese als Bande A bezeichnete GUN4-Variante ist durch eine langsamere Migration im SDS-Gel gekennzeichnet. Die dritte GUN4-Spezies (Bande C), welche die schnellste Migration im SDS-Gel aufwies, konnte im Licht nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden. In Extrakten von in der Dunkelheit angezogenen Pflanzen zeigte sich eine von der Lichtsituation verschiedene quantitative Verteilung der GUN4-Spezies. Während die GUN4-Bande A vollständig fehlte, wurde eine annähernde Gleichverteilung zwischen Bande B und C nach fünf Tagen Etiolierung beobachtet (Abbildung 3.63 A). Im Übergang zum Licht verschob sich das Bandenmuster innerhalb von zwei bis sechs Stunden nach Belichtungsbeginn zugunsten von Bande „B“ und „A“.

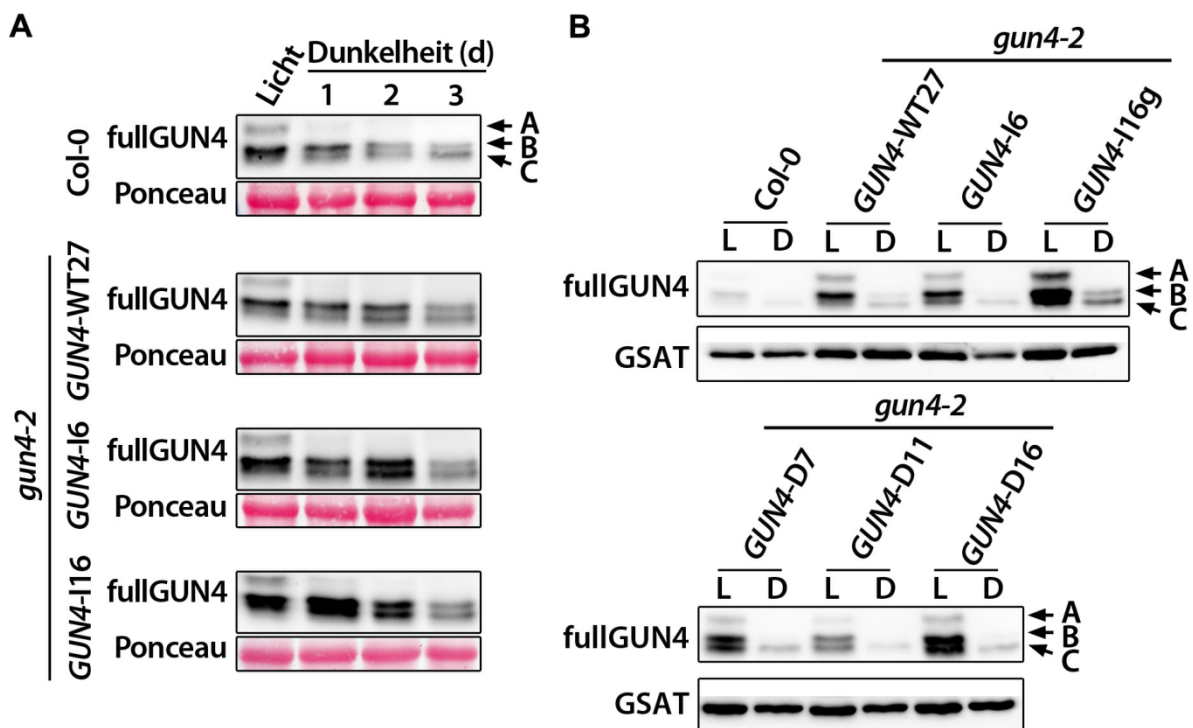
Im Vergleich zur Anzucht im Normallicht ( $120 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) führte die kurzzeitige Inkubation von *At* WT-Pflanzen im Schwach- ( $20 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), bzw. Hochlicht ( $600 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) nicht zu einer Veränderung des Verhältnisses zwischen den GUN4-Banden (Abbildung 3.63 B). Erst nach 24-stündiger, bzw. viertägiger Dunkelinkubation war eine Abnahme der Bande A und eine Zunahme der Bande C im Verhältnis zur Lichtsituation zu beobachten. Nach vier Tagen Anzucht in der Dunkelheit lagen die Banden B und C in etwa gleicher Menge vor (Abbildung 3.63 B).

Auch die Anzucht in der Kälte (8 Tage bei  $4^{\circ}\text{C}$ , Kurztag) führte zu einer Veränderung des GUN4-Bandenmusters. Zusätzlich zur Bande A wurde eine Gleichverteilung der Banden B und C in Extrakten von unter Kältestress angezogenen *At* Pflanzen beobachtet (Abbildung 3.63 C). Dieser Befund stand im Gegensatz zur Lichtsituation bei Raumtemperatur ( $22^{\circ}\text{C}$ ), in welcher die Bande C, im Vergleich zur Intensität der Bande B, deutlich unterrepräsentiert war (Abbildung 3.63 A und B). Aus der Analyse der zuvor eingeführten *gun4-2* Komplementationslinien (*GUN4*-WT und *GUN4-I*) wurde deutlich, dass das Auftreten der GUN4-Spezies unabhängig von der Phosphorylierung des GUN4 war (Abbildung 3.63 C).

Somit konnten Wachstumsbedingungen identifiziert werden, welche zu einer Veränderung im immunologisch nachweisbaren GUN4-Bandenmuster in einem *At* Proteinextrakt führten. Dabei zeigte sich, dass Kälte und vielmehr noch die Abwesenheit von Licht einen maßgeblichen Einfluss auf die Präsenz der Banden A, B und C hatte. Offen blieb dabei zunächst, ob der Veränderung des GUN4-Bandenmusters eine oder mehrere Modifikationen zu Grunde lagen.

### 3.11.2 Die zusätzliche GUN4-Modifikation wird in der Dunkelheit induziert und ist unabhängig von der GUN4-Phosphorylierung

Wie im vorhergehenden Abschnitt gezeigt, wurde eine deutliche Veränderung des GUN4-Bandenmusters in der Dunkelheit beobachtet. Um den Prozess der zusätzlichen Modifikation in der Dunkelheit besser verstehen zu können, wurden zeitaufgelöste Kinetiken nach dem Wechsel in eine Dunkelphase durchgeführt. Dabei wurde der Einfluss der GUN4-Phosphorylierung auf die zusätzliche Modifikation in den zuvor erzeugten *gun4-2* Komplementationslinien (*GUN4*-WT, *GUN4*-I und *GUN4*-D) untersucht (Abbildung 3.64).



**Abbildung 3.64: Western-Blot-Analyse des GUN4-Bandenmusters nach längerer Dunkelinkubation von Col-0 und *gun4-2* Komplementationslinien (*GUN4*(WT):*GUN4*-WT, *GUN4*(S264I):*GUN4*-I und *GUN4*(S264D):*GUN4*-D).**

(A) Die unterschiedlichen Genotypen (rechte Spalte) wurden am Ende einer Lichtphase (Spur 1: „Licht“) für 1, 2, 3 Tage in der Dunkelheit inkubiert. Das GUN4-Bandenmuster (Bande A, B, C) ist exemplarisch für Col-0 gezeigt. (B) Vergleich des GUN4-Bandenmusters zwischen Licht (L) und 5-tägiger Dunkelinkubation (D) in Col-0 und *gun4* Komplementationslinien. Während das GUN4-Protein im Licht hauptsächlich als Bande A und B akkumuliert, verschob sich dieses Verhältnis zu den Banden B und C (nach 3 Tagen Dunkelheit) und weiter zur Bande C (5 Tage Dunkelheit). Die *gun4-2*/*GUN4*-D Linien zeigten bereits im Licht ein höheren Gehalt der Bande C im Vergleich zur Bande B und dem Muster der anderen Genotypen.

Zunächst wurden der *At* Col-0 WT und die *gun4-2*/*GUN4*-WT und *gun4-2*/*GUN4*-I Linien im Verlauf einer verlängerten Dunkelphase analysiert. Unabhängig von der Möglichkeit GUN4 zu phosphorylieren, zeigten alle analysierten Genotypen dasselbe Bild: im Vergleich zur Lichtphase wurde bereits nach einem Tag Dunkelinkubation eine Abnahme der im Licht deutlich zu erkennenden Bande A beobachtet (Abbildung 3.64 A). Im weiteren Verlauf nahm die durch die Bande C

repräsentierte GUN4-Variante zu, bis diese an Tag zwei/drei der Dunkelinkubation in äquivalenten Mengen zur Bande B vorlag (Abbildung 3.64 A).

Die Verlängerung der Dunkelpase ergab, dass im Vergleich zur Lichtphase nach fünf Tagen Dunkelheit nur noch die GUN4-Bande C in den analysierten Genotypen detektiert werden konnte (Abbildung 3.64 B, Spuren „D“). Interessanterweise zeigten die *gun4-2/GUN4-D* Linien bereits im Licht ein verändertes GUN4-Bandenmuster. Im Gegensatz zu den Kontrolllinien, wie etwa die *gun4-2/GUN4-I*, war die Bande C bereits im Licht in Extrakten der *gun4-2/GUN4-D* Mutanten deutlich zu detektieren (Abbildung 3.64 B). Obwohl die Phosphorylierung nicht notwendig zu sein schien, führte das Phosphomimikry von GUN4 bereits im Licht zur zusätzlichen GUN4-Modifikation (Abbildung 3.64 B).

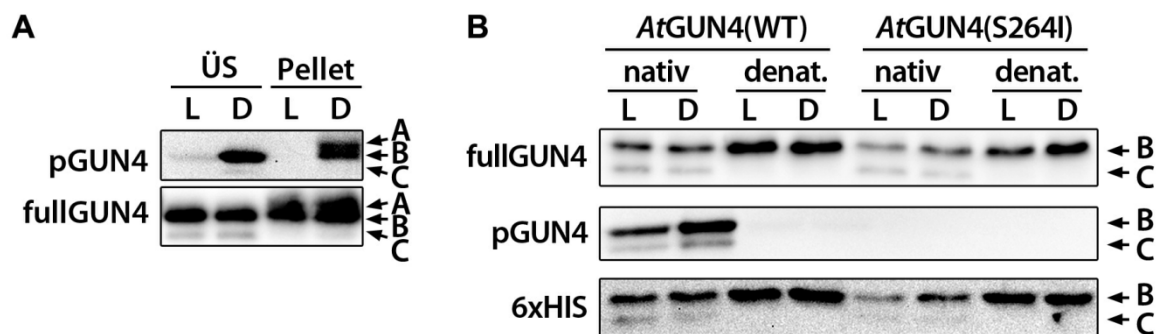
Aus allen hier gezeigten Experimenten wurde ein Zusammenhang deutlich: wann immer die GUN4-Spezies der Bande C präsent war (Dunkelheit), konnte weniger GUN4 im Vergleich zu Kontrollbedingungen (Licht) detektiert werden. Wenngleich es nachvollziehbar war, dass die Expression des *GUN4* in der Dunkelheit reduziert wurde, lag die Vermutung nahe, dass die zusätzliche Modifikation im Zusammenhang mit dem Abbau von GUN4 stand.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die veränderten Laufeigenschaften des GUN4 im SDS-Gel auf mindestens eine zunächst unbekannte zusätzliche Modifikation des GUN4 zurückzuführen ist. Ferner konnte beobachtet werden, dass die Modifikation, die zur durch die Bande C repräsentierten GUN4-Spezies führte, in der Dunkelheit induziert und (möglicherweise) im Licht revertiert wurde. Ferner wurde die Anreicherung der durch die Bande C repräsentierte GUN4-Variante in den *gun4-2/GUN4-D* Linien und unter Kältestress beobachtet. Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass die GUN4-Variante der Bande C unter ungünstigen Wachstumsbedingungen akkumuliert.

### 3.11.3 *In vitro* Untersuchungen zur zusätzlichen GUN4-Modifikation

Im Zuge der Analysen zur *in vitro* Phosphorylierung von GUN4 wurde festgestellt, dass die Inkubation von rekombinantem GUN4 mit einem Pflanzenextrakt (Kinaseassay) zu einem veränderten Laufverhalten des GUN4-Proteins führte (Vergleich Abschnitt 3.1.3, S.122). Dabei wurde beobachtet, dass die GUN4-Spezies nach einem Kinaseassay in unterschiedlichen Fraktionen vorlagen (Abbildung 3.65 A). Die durch die Bande B repräsentierte GUN4-Spezies fand sich sowohl im löslichen Überstand als auch in der Pelletfraktion. Bande C wurde hingegen nur im löslichen Überstand und Bande A ausschließlich in der Pelletfraktion, vermutlich gebunden an die Thylakoidmembran, detektiert (Abbildung 3.65 A). An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass die Pelletfraktion für die in Abbildung 3.65 A gezeigte Analyse um den Faktor 10-20 aufkonzentriert wurde. Ein quantitativer Vergleich der GUN4-Verteilung zwischen Überstand und Pelletfraktion war daher nur bedingt

zulässig. Dennoch ließ sich feststellen, dass die Verteilung zwischen den Fraktionen des Kinaseassays unabhängig von der Phosphorylierung des GUN4 war. Sowohl das deutlich phosphorylierte (Dunkelinkubation, „D“) und das im Licht weniger stark phosphorylierte GUN4 fanden sich in gleichen Mengen in den zwei Fraktionen des Kinaseassays (Abbildung 3.65 A, Vergleich fullGUN4-Signal in „L“ und „D“).



**Abbildung 3.65: Western-Blot-Analyse der Bandenverteilung von rekombinanten GUN4-Proteinen nach einem *in vitro* Kinaseassay.**

(A) Fraktionierung eines GUN4-Kinaseassays in den löslichen Überstand (ÜS) und die Membranfraktion (Pellet). Der Kinaseassay wurde mit AtGUN4(WT) als Substrat im Licht (L) oder Dunkelheit (D) durchgeführt. Die Fraktionierung wurde im Anschluss an den Assay durchgeführt. Die Banden B und C akkumulierten im löslichen Überstand. Die Membranfraktion enthielt die Banden „A“ und B. (B) AtGUN4(WT) und AtGUN4(S264I) wurden mit nativem („nativ“) oder hitzeinaktiviertem („denat.“) Thylakoidextrakt inkubiert (Kinaseassay) und die lösliche Fraktion des Assays mittels Western-Blot analysiert. Die Analyse mit dem phosphorylierungsspezifischen pGUN4 Antikörper (gerichtet gegen den C-terminus) sowie die Signale des HIS-tag Antikörpers (N-Terminus der rekombinanten Proteine) bewiesen die Vollständigkeit der GUN4-Proteine nach dem Kinaseassay. Die Aufspaltung der GUN4-Proteine in der löslichen Fraktion eines Kinaseassays in die Banden B und C ist hervorgehoben. L= Kinaseassay im Licht; D= Kinaseassay im Dunkeln. Diese Abbildung wurde in Richter et al. (2016b) veröffentlicht.

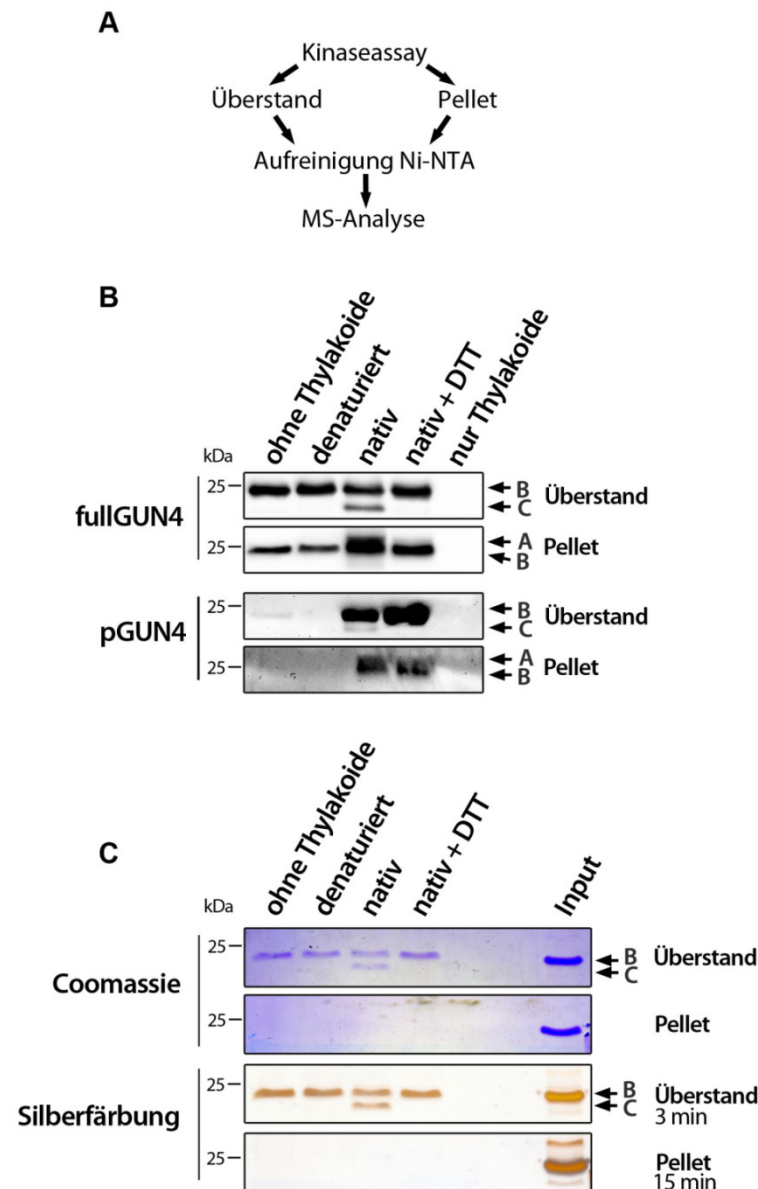
Dass die zusätzliche Modifikation unabhängig von der Phosphorylierung des GUN4 war, zeigte auch eine Analyse mit nicht-phosphorylierbarem AtGUN4(S264I) (Abbildung 3.65 B). Die nach einem Assay detektierte Aufteilung der Varianten des rekombinanten GUN4(WT) wurde trotz ausbleibender Phosphorylierung ebenfalls für das rekombinante GUN4(S264I)-Protein festgestellt (Abbildung 3.65 B, fullGUN4- und pGUN4-Signale).

Der Befund, dass beide rekombinanten Proteine nur durch einen nativen Extrakt modifiziert werden konnten, schloss die Möglichkeit eines Artefaktes durch die Auftrennung des rekombinanten Proteins im SDS-Gel aus und deutete vielmehr auf eine spezifische Enzymaktivität, die zur Modifikation von GUN4 führte (Abbildung 3.65 B, Vergleich fullGUN4-Signal für „nativ“ mit „denat.“). Ausgeschlossen werden konnte ebenfalls, dass die sich in der löslichen Fraktion des Kinaseassays befindliche Bande C durch eine verkürzte GUN4-Variante repräsentiert wurde. Sowohl der gegen den am N-Terminus befindliche HIS-tag als auch der gegen den phosphorylierten C-Terminus gerichtete Antikörper konnten die GUN4-Spezies der Bande C detektieren (Abbildung 3.65 B). Daher wurde das GUN4 während eines Kinaseassays weder N-terminal noch C-terminal verkürzt.

#### 3.11.4 Anreicherung der GUN4-Spezies nach einem Kinaseassay

Mit dem Ziel einer anschließenden massenspektrometrischen Analyse, sollten die verschiedenen GUN4-Spezies nach einem Kinaseassay angereichert werden (Abbildung 3.66). Hierfür wurde eine Inkubation im vergrößerten Maßstab durchgeführt (Faktor 10 im Vergleich zum Standardassay) und im Anschluss in den löslichen Überstand und die Pelletfraktion aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine der Pelletfraktion mit 0,5%  $\beta$ -Dodecylmaltosid (DM) solubilisiert. Die so gewonnenen Fraktionen wurden mit der Ni-NTA-Matrix inkubiert und die mit dem HIS-tag markierten GUN4-Proteine aus dem Kinaseassay aufgereinigt (Abbildung 3.66 A).

Als Kontrolle für den eigentlichen Kinaseassay wurde das rekombinante GUN4(WT) ohne oder mit hitzeinaktivierten (denaturierten) Thylakoiden inkubiert. Wie zuvor beobachtet, fand innerhalb dieser Kontrollreaktionen weder eine Modifikation noch eine Phosphorylierung des GUN4 statt (Abbildung 3.66 B). Die mit nativen Thylakoidextrakten durchgeführten Inkubationen von GUN4 führten zur Modifikation und Phosphorylierung des GUN4. Die Phosphorylierung konnte für die GUN4-Banden A, B und C nachgewiesen werden (Abbildung 3.66 B). Die Anwesenheit von DTT hatte keinen Einfluss auf die Phosphorylierung, verhinderte jedoch die Modifikation des GUN4 (Abbildung 3.66 B und C).



**Abbildung 3.66: Anreicherung der verschiedenen GUN4-Spezies für die massenspektrometrische Analyse.**

(A) Schema der Durchführung der Anreicherung. Zunächst wurde 100 µg rekombinantes AtGUN4(WT) mit einem Thylakoidextrakt inkubiert (finales Volumen 1 ml). Anschließend wurde der Assay in Überstand und Pellet-Fraktion getrennt. Die Fraktionen wurden auf eine Ni-NTA-Matrix gegeben und das gebundene GUN4 eluiert. Die Pelletfraktion wurde um den Faktor 10 aufkonzentriert. (B) Western-Blot-Analyse der Ausgangsfraktionen vor der Aufreinigung. Aufgetragen sind Kinaseassaysätze mit denaturierten und nativen Thylakoiden und ein Aliquot eines Kinaseassays mit 2 mM DTT. Als Kontrolle wurden GUN4 ohne Thylakoide und Thylakoide ohne rekombinantes GUN4 aufgetragen. (C) Coomassie- und Silberfärbung der Elutionsfraktionen nach SDS-PAGE. Zusätzlich wurde das rekombinante GUN4 in der Ausgangskonzentration des Kinaseassays ohne Aufreinigungsschritt aufgetragen (Input). Das Gel der Silberfärbung der Pelletfraktionen wurde für 15 min entwickelt, ohne dass sich Banden abzeichneten. Die Coomassie gefärbten Banden B und C des Kinaseassays mit nativem Thylakoidextrakt wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Die hier gezeigten Daten wurden teilweise im Rahmen der Bachelorarbeit von A. Kwast erzeugt.

Nachdem die Anwesenheit der durch die Banden A, B und C repräsentierten GUN4-Spezies überprüft wurde, wurden diese aus dem Kinaseassay aufgereinigt und Eluate mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 3.66 C). Im Gegensatz zur Aufreinigung aus der Pelletfraktion, war die Anreicherung der GUN4-Banden B und C aus dem löslichen Überstand des Kinaseassays erfolgreich (Abbildung 3.66 C).



Sowohl in der Coomassie- als auch in der Silberfärbung waren die Banden B und C für die Reaktion mit nativen Thylakoiden sichtbar. Für die Pelletfraktion konnten keine Signale nach den hier angewendeten Färbemethoden detektiert werden. Ursächlich hierfür könnte zum einen die unzureichende Anreicherung aus der Pelletfraktion sein. Die Menge der GUN4-Spezies, welche in der Pelletfraktion vor der Aufreinigung detektiert wurde (Abbildung 3.66 B), war in etwa um den Faktor 10-20 geringer, als die Mengen, die im löslichen Überstand für die GUN4-Spezies festgestellt wurden. Auf der anderen Seite konnte nicht ausgeschlossen werden, dass sich die vorgeschaltete Solubilisierung mit  $\beta$ -DM negativ auf den Aufreinigungserfolg auswirkte.

Da jedoch die Banden B und C des löslichen Überstandes in der Coomassiefärbung deutlich sichtbar und im SDS-Gel getrennt waren, wurden jene aus dem Proteingel ausgeschnitten und für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet. Die Messung und Auswertung der MS-Analyse wurde durch A. Rödiger (AG Prof. S. Baginsky, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt.

### 3.11.5 Auswertung der massenspektrometrischen (MS) Analyse der GUN4-Banden B und C.

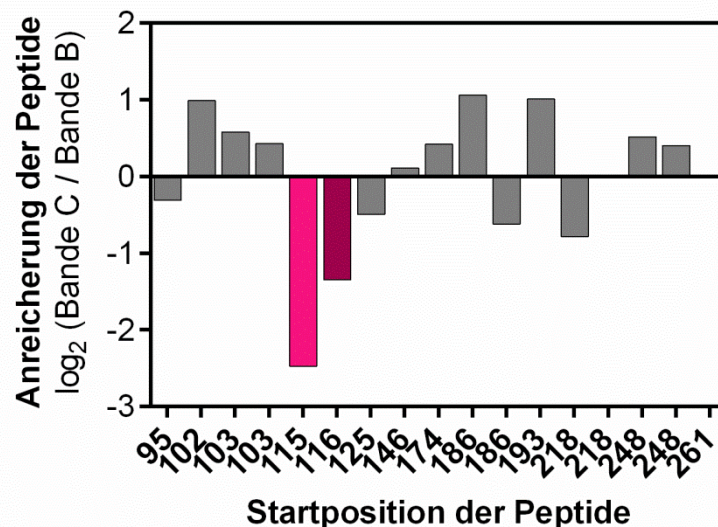
Die für die Banden B und C identifizierten Peptide sind in Tabelle XX dargestellt. Im Wesentlichen wurden alle theoretisch vorhandenen Peptide, welche durch den tryptischen Verdau vor der MS-Analyse entstanden, für das rekombinante GUN4 in den Banden B und C nachgewiesen. Bei der genaueren Betrachtung der einzelnen Peptide ergaben sich jedoch quantitative Unterschiede zwischen der Bande B und C (Abbildung 3.67).

**Tabelle XX: Alle identifizierten Peptide der massenspektrometrischen (MS) Analyse der GUN4 Banden B und C.**

Die Punkte nach Tryptophan (R) und Lysin (K) markieren die Schnittstelle des tryptischen Verdaus vor der MS-Analyse. Die Startposition ist relativ zum Startmethionin (Position 1) des *Arabidopsis* GUN4 angegeben und beginnt nach der jeweiligen Schnittstelle („.“).

Startposition des Peptids	Sequenz
95	R.QADEETR.R
102	R.RLLIQISGEAAVK.R
103	R.LLIQISGEAAVK.R
103	R.LLIQISGEAAVKR.G
115	K.RGYVFFSEVK.T
116	R.GYVFFSEVK.T
125	K.TISPEDLQAIDNLWIK.H
146	R.FGYSVQR.K
174	K.LLDTEVVQYNYR.A
186	R.AFPDEFK.W
186	R.AFPDEFKWELNDETPLGHLPLTNALR.G
193	K.WELNDETPLGHLPLTNALR.G
218	K.CVLSHPAFATADDNSGETEDELNR.G
218	K.CVLSHPAFATADDNSGETEDELNRGVAVAK.E
248	K.EQAGVGADK.R
248	K.EQAGVGADK.R.V
261	K.TNYSF

Für die quantitative Auswertung der Peptide wurden die Spektren für ein Peptid in den Banden B und C aufsummiert. Anschließend wurde die Anzahl der Spektren eines Peptids auf die insgesamt zugeordneten GUN4-Spektren einer Bande normiert. Daraus ergab sich die relative Häufigkeit eines Peptids innerhalb einer Bande. Abschließend wurden die so für die Bande B und C normalisierten Peptidspektren ins Verhältnis gesetzt. Die daraus resultierende differentielle Anreicherung eines Peptids in den Banden ist in Abbildung 3.67 dargestellt (angegeben als  $\log_2$ ).



**Abbildung 3.67: Ergebnis der MS-Analyse der angereicherten Banden B und C aus einem GUN4-Kinaseassay.**

Die Anzahl der gefundenen Spektren eines Peptides einer Bande wurde auf die Gesamtzahl der identifizierten Spektren einer Bande normalisiert. Die so normalisierte Spektrenzahl jedes Peptides der Bande C wurde in das Verhältnis zur normalisierten Spektrenzahl der zweiten Bande „B“ gesetzt ( $\log_2$ ). Die farblich markierten Balken zeigen ein Peptid mit zwei Startpositionen (115 und 116) (Aufeinanderfolge von „KR“), das in der modifizierten Bande C deutlich unterrepräsentiert war. Die hier gezeigten Daten wurden teilweise im Rahmen der Bachelorarbeit von A. Kwast erzeugt. Die massenspektrometrische Bestimmung der Peptide erfolgte durch A. Rödiger (AG Prof. S. Baginsky, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg).

Aus der quantitativen Analyse ging hervor, dass sich in der Verteilung der meisten Peptide zwischen Bande B und C keine drastischen Unterschiede ergaben. So waren der Großteil der Peptide zwischen der Bande B und C in etwa gleich verteilt (Grenzen  $0,5 \cdot 2^x$  / in  $\log_2$ : -1 bis 1) (Abbildung 3.67, graue Balken). Im Gegensatz dazu wurden zwei Peptide identifiziert, die eine deutlich veränderte quantitative Präsenz zwischen Bande B und C aufwiesen. Die Peptide mit der Startposition 115 und 116 (Tabelle XX) spiegelten dabei das Peptid GYVFFSEVK wider (ohne Trypsin-Schnittstellen). Die Quantifizierung ergab, dass das Peptid(115) in einem Verhältnis von Bande C/ Bande B von 0,18 (in  $\log_2$ : -2,4) und das Peptid(116) in einem Verhältnis von Bande C/ Bande B von 0,39 (in  $\log_2$ : -1,3) in der Bande C vorlag. Damit war das gemeinsame Peptide (115+116) in der dem modifizierten GUN4 entsprechenden Bande C deutlich unterrepräsentiert.

Wenngleich die tatsächliche Ursache für die verminderte Detektion dieses Peptids während der MS-Analyse bis zu diesem Zeitpunkt ungeklärt bleibt, wurden zwei Erklärungsansätze in Betracht

gezogen. Einerseits ist es denkbar, dass das entsprechende Peptid aus dem GUN4 der Bande C durch den Thylakoidextrakt herausgeschnitten und somit nicht oder in verminderten Mengen während der MS-Analyse detektiert wurde. Wahrscheinlicher ist aber, dass das GUN4 der Bande C innerhalb des unterrepräsentierten Peptids an einer AS modifiziert wurde und die zugehörigen Spektren dieses Paptides verändert waren. Ohne die Kenntnis der Natur der Modifikation konnten die modifizierten Spektren dem GUN4-Protein nicht zugeordnet werden. Erst wenn die Modifikation und die dazugehörige Veränderung der Masse des Peptides bekannt sind, können die entsprechenden Spektren durch den Auswertungsalgorithmus dem GUN4 zugeordnet werden.

### 3.11.6 GUN4 wird zusätzlich an einem konservierten Peptid modifiziert

Es konnte somit angenommen werden, dass es sich bei der durch die Bande C repräsentierten GUN4-Variante um eine post-translational modifizierte Version des Proteins handelte. Daher wurden im Folgenden weitergehende Analysen zur modifizierten Aminosäure (AS) und einer möglichen physiologischen Konsequenz dieser Modifikation auf die GUN4-Funktion angestrebt.

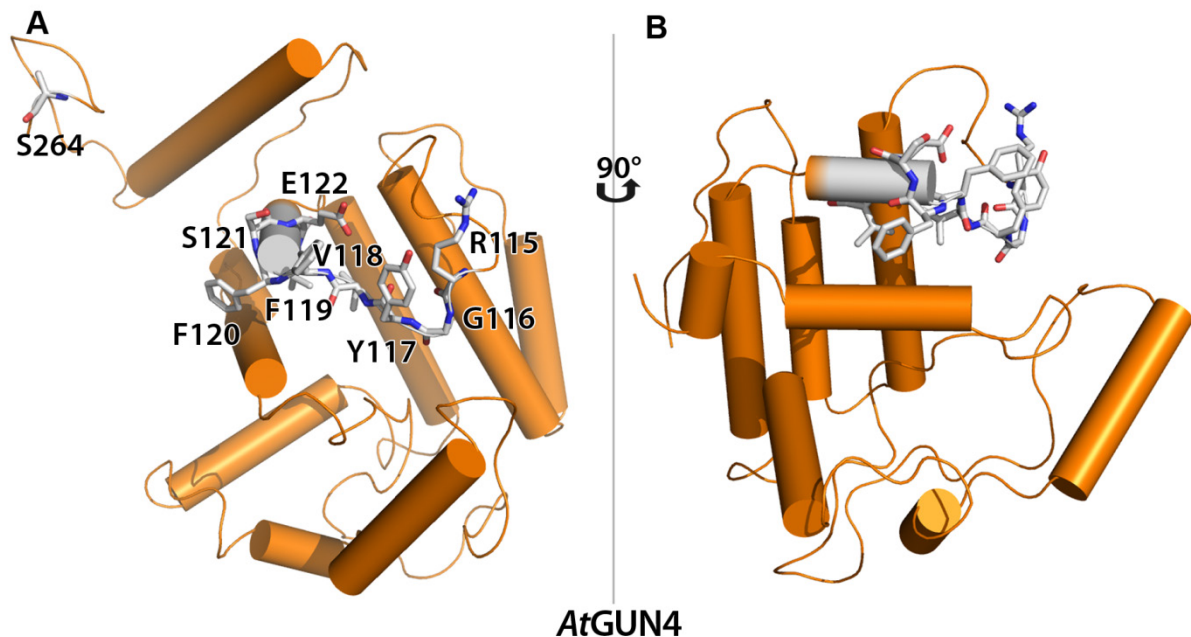
Ein Alignment des in der Bande C unterrepräsentierten Peptids ergab, dass es sich um einen konservierten Bereich der GUN4-Homologe oxygener photosynthetisch aktiver Organismen handelt (Abbildung 3.68). Der Vergleich der GUN4-Homologe aller analysierten Organismen zeigte ein hochkonserviertes Konsensusmotiv für diesen GUN4-Bereich von **RXXXXFXXV**. Betrachtete man hingegen nur die Gruppe der Angiospermen, mit Vertretern wie zum Beispiel Pappel, Mais, Ricinus, oder Reis, wurde eine hundertprozentige Konservierung des Peptides (**RGYVFFSEV**) festgestellt (Abbildung 3.68).

	115
Arabidopsis thaliana	KRGYVFFSEVK
Oryza sativa	RRGYVFFSEVQ
Ricinus communis	KRGYVFFSEVQ
Vitis vinifera	KRGYVFFSEVQ
Zea mays	RRGYVFFSEVQ
Populus trichocarpa	KRGYVFFSEVQ
Sorghum bicolor	RRGYVFFSEVQ
Physcomitrella patens	KRKWVYFSEVK
Clamydomonas reinhardtii	KRNWVYFTEVK
Anabaena variabilis ATCC 29413	KRKWLYFTDVD
Nostoc punctiforme PCC 73102	QRKWL YFTEVE
Microcystis aeruginosa PCC 7806	QRKWL YFTEVE
Synechocystis sp. PCC 6803	QRQWL YFTEVE
Synechococcus sp. WH 8109	KRGYVYFTEVA
Consensus	KRGYVFFSEV

**Abbildung 3.68: Alignment des in der Arabidopsis GUN4-Bande C unterrepräsentierten Peptids.**

Hochkonservierte Aminosäuren sind Dunkelgrau, konservierte Aminosäuren sind Hellgrau unterlegt. Die Position 115 bezieht sich auf das Startmethionin des AtGUN4.

Aus der Visualisierung des entsprechenden Peptids in einer vorhergesagten Kristallstruktur des *AtGUN4* ging hervor, dass die enthaltenen AS, bzw. deren (reaktive) Seitengruppen, fast ausschließlich an der Oberfläche der GUN4-Kerndomäne zu finden waren (Abbildung 3.69). Damit war zumindest die physikalische Voraussetzung für die enzymatische Modifikation einer in dem Peptid zu findenden AS gegeben.



**Abbildung 3.69: Visualisierung des in der Bande C unterrepräsentierten Peptides in einer vorhergesagten Tertiärstruktur des *AtGUN4*.**

(A) Die Aminosäuren des in der modifizierten Bande C unterrepräsentierten Peptides sind hervorgehoben. (B) Struktur aus (A), gedreht um 90°. Für die Darstellung in B wurde der C-Terminus (mit der Phosphorylierungsstelle S264) entfernt. Die Seitengruppen der meisten Aminosäuren des Peptides sind zur Oberfläche des Proteins ausgerichtet.

### 3.11.7 Hinweis auf die modifizierte Aminosäure des hochkonservierten Peptides von *AtGUN4*

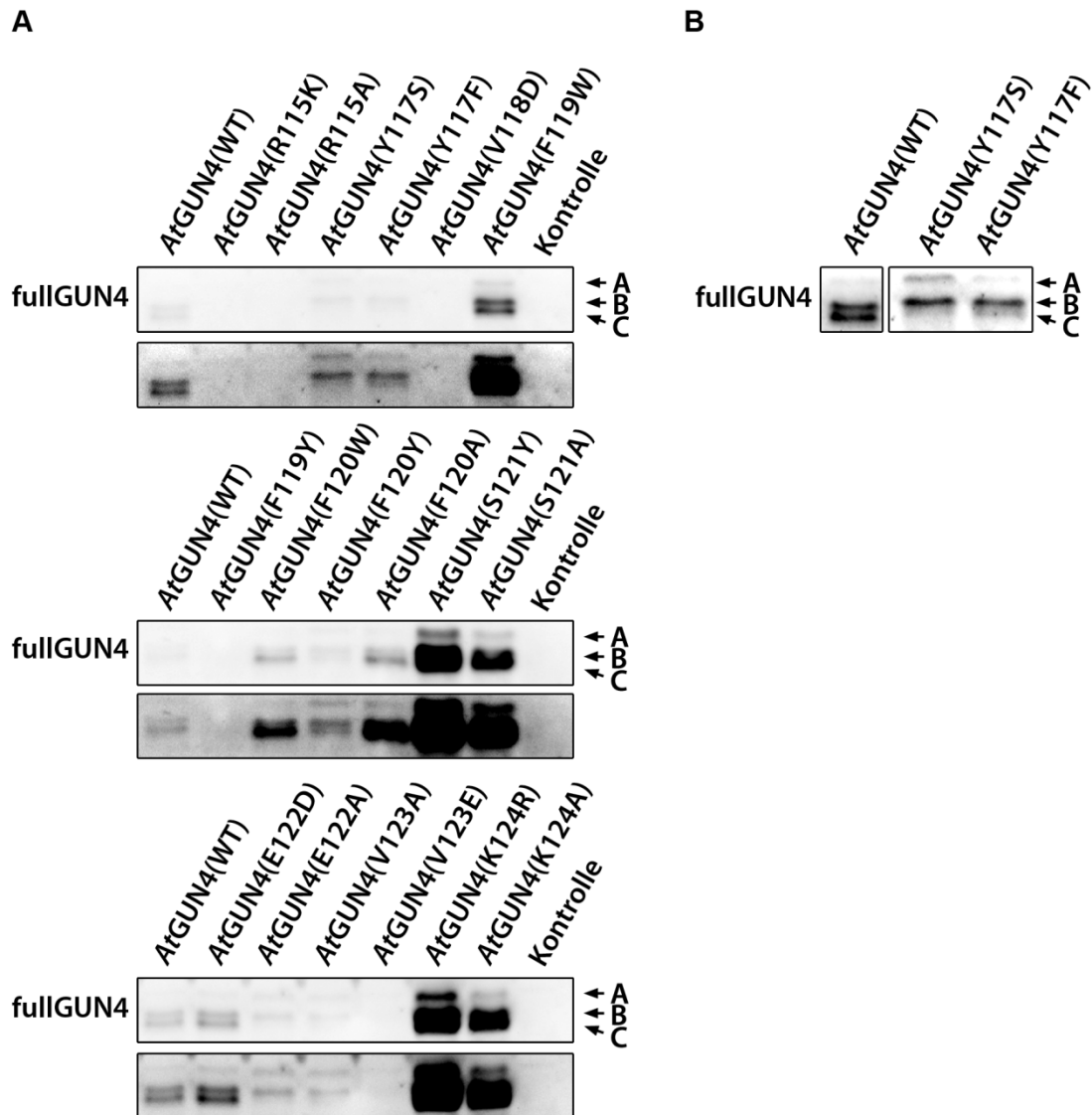
Das zuvor identifizierte Peptid - KRGYVFFSEV - enthielt eine Reihe von Aminosäuren, für deren Seitengruppen eine post-translationale Modifikation gezeigt wurde (Friso und van Wijk, 2015). Mit dem Ziel, die in der Bande C modifizierte AS zu identifizieren, wurden Punktmutationen in die kodierende Sequenz von *AtGUN4* eingeführt, die zu einem Austausch der entsprechenden AS führten. Dabei wurden die Mutationen so gewählt, dass eine im Peptid befindliche AS zu einer AS der chemisch gleichen und einer chemisch anderen Gruppe ausgetauscht wurde (Tabelle XXI). Die Punktmutationen wurden in ein *GUN4*-Konstrukt zur transienten Pflanzentransformation eingebracht (pCambia3301\_AtGUN4(WT)).

**Tabelle XXI: Übersicht über die in das pCambia3301\_AtGUN4(WT) Konstrukt eingeführten Basen/Aminosäureaustausche.**

Die Basenaustausche wurden mittels SDM-PCR eingeführt. Die jeweils zweite Spalte gibt Auskunft über den Status der Klonierungsarbeiten zum Zeitpunkt des Verfassens der vorliegenden Arbeit. Die hier gezeigten Daten wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von A. Kwast erzeugt.

Aminosäureaustausch	Konstrukt erstellt?	Aminosäureaustausch	Konstrukt erstellt?
R115K	Ja	F120W	Ja
R115A	Ja	F120Y	Ja
G116A	Nein	F120A	Ja
G116E	Nein	S121Y	Ja
Y117S	Ja	S121A	Ja
Y117F	Ja	E122D	Ja
Y117A	Nein	E122A	Ja
V118A	Nein	V123A	Ja
V118D	Ja	V123E	Ja
F119W	Ja	K124R	Ja
F119Y	Ja	K124A	Ja
F119A	Nein		

Im Rahmen eines Screens wurden die verschiedenen AtGUN4-Varianten transient in Blättern von *Nicotiana benthamiana* exprimiert. Anschließend wurden Proteinextrakte der transformierten Blätter mittels Western-Blot hinsichtlich des GUN4-Bandenmusters analysiert. Für dieses Experiment konnte die Tatsache genutzt werden, dass der gegen das AtGUN4 gerichtete Antikörper das Tabak GUN4-Homolog nicht erkennt (Peter und Grimm, 2009). Ziel des Screens war die Identifikation von Varianten, bei denen die Bande C bei transientser Expression fehlte.



**Abbildung 3.70: Transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana* Blättern mittels Agrobakterien vermittelter Transformation von *Arabidopsis* (At)GUN4(WT) und mutierten Konstrukten.**

Jedes Konstrukt wurde in ein eigenes Blatt infiltriert. Es wurde dieselbe Anzahl von Blattscheiben je Konstrukt analysiert. Die Position des Austausches und die mutierte Aminosäure sind angegeben. Kontrolle= Proteinextrakt eines nicht infiltrierten Blattes. Der fullGUN4-Antikörper detektiert das Tabak GUN4 nicht. (A) Übersicht aller transformierten Konstrukte. Die jeweils zweite Abbildung des Western-Blot-Ergebnisses wurde im Kontrast verstärkt. (B) Proben der Infiltration von AtGUN4(WT), AtGUN4(Y117S) und AtGUN4(Y117F) aus (A) mit angepasstem Kontrast. Die drei immunreaktiven Banden des AtGUN4 im Tabakhintergrund, analysiert mit dem fullGUN4 Antikörper, sind mit A, B, C gekennzeichnet.

Die Western-Blot-Analyse der überexprimierten Punktmutanten, die zum Austausch einer AS innerhalb des modifizierten GUN4-Peptides führten, ergab ein gemischtes Bild (Abbildung 3.70 A). Für einzelne Konstrukte, bzw. deren GUN4-Produkte, konnten keine Signale mit dem gegen das AtGUN4 gerichteten Antikörper detektiert werden (zum Beispiel R115K, R115A oder V118D und F119Y). Für andere AS-Substitutionen ergab sich im Vergleich zur parallel infiltrierten GUN4(WT)-Kontrolle wiederum eine starke Überexpression des GUN4-Konstruktes (S121Y und S121A oder K124R und K124A) (Abbildung 3.70 A). Ursächlich für die beobachteten Unterschiede könnten neben

der suboptimalen Transformationseffizienz und Unterschieden in der Expressionsstärke der Konstrukte auch mutationsbedingte Veränderungen der Stabilität sein. Auf diesen Aspekt soll jedoch an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden.

Es war zu beobachten, dass der Austausch einer AS im modifizierten GUN4-Peptid, mit einer Ausnahme, keinen Einfluss auf das GUN4-Bandenmuster hatte. Die infiltrierten *GUN4*(WT)-Kontrollen führten zu einer Akkumulation aller drei immunoreaktiven GUN4 Banden (A, B, C), wenngleich das Verteilungsmuster dieser Banden im Vergleich zu *At* Proteinextrakten leicht variierte (siehe vorherige Abschnitte) (Abbildung 3.70 A). Unabhängig von der Expressionsstärke zeigten die meisten GUN4-Mutanten das gleiche Bandenmuster wie die *GUN4*(WT)-Kontrolle (zum Beispiel F119W, F120W/Y oder E122D). Der auffälligste Unterschied in den detektierten GUN4 Banden zeigte sich für die Konstrukte, die zum Austausch des Tyrosin(117) führten (Abbildung 3.70 A). Für die Konstrukte Y117S und Y117F konnte gezeigt werden, dass die Bande C, also das modifizierte GUN4, deutlich unterrepräsentiert war. Im Vergleich zum *GUN4*(WT) führte die Expression von *GUN4*(Y117S), bzw. *GUN4*(Y117F) zu einer deutlichen Reduktion der Bande C, bei gleichzeitiger Zunahme der Bande A (Abbildung 3.70 B).

Abschließend lässt sich festhalten, dass das Tyrosin(117) innerhalb des als offensichtlich post-translational modifiziert vorliegenden Peptids – KRGYVFFSEV – einen direkten oder indirekten Einfluss auf das in Pflanzenextrakten immunologisch nachweisbare GUN4-Bandenmuster hatte. Möglicherweise handelt es sich bei diesem Tyrosin um die AS, an der die zusätzliche GUN4-Modifikation stattfand.

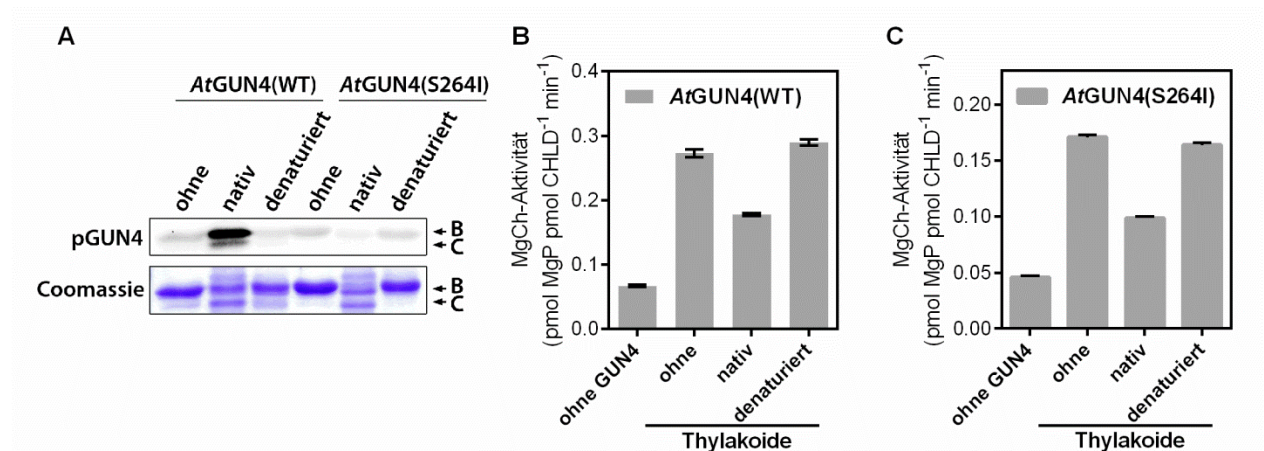
### 3.11.8 Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der zusätzlichen

#### Modifikation und der Funktion von GUN4

Die möglicherweise an der Oberfläche des GUN4 stattfindende zusätzliche Modifikation könnte einen Einfluss auf dessen Funktion haben. Da die primäre Funktion von GUN4 die Stimulation der MgCh ist, sollte der funktionelle Zusammenhang zwischen zusätzlicher GUN4 Modifikation und der Stimulation der MgCh untersucht werden.

Für dieses Experiment wurden sowohl das rekombinante *AtGUN4*(WT) als auch *AtGUN4*(S264I) im Rahmen eines Kinaseassays mit nativen *At* Extrakten inkubiert (Abbildung 3.71 A). Analog zu den vorherigen Experimenten führte die Inkubation mit nativen Thylakoiden, im Vergleich zu den Kontrollinkubationen ohne Thylakoide oder mit hitzeinaktivierten Thylakoiden, zur Aufspaltung des *AtGUN4*(WT) und *AtGUN4*(S264I) in die Banden B und C (Abbildung 3.71 A, lösliche Fraktion des

Kinaseassay analysiert). In Anwesenheit des nativen Thylakoidextraktes wurde nur das AtGUN4(WT) phosphoryliert.



**Abbildung 3.71: *In vitro* MgCh-Assay mit *Arabidopsis* (At)GUN4(WT), AtGUN4(S264I), die zuvor mit Thylakoidextrakten von At-Pflanzen inkubiert wurden.**

(A) Die GUN4-Proteine wurden ohne („ohne“), mit nativem („nativ“) oder hitzeinaktiviertem („denaturiert“) Thylakoidextrakt inkubiert (Kinaseassay) und anschließend die lösliche Fraktion des Kinaseassay mittels SDS-PAGE analysiert. Der Western-Blot mit dem phosphorylierungsspezifischen Antikörper (pGUN4) zeigte ein Signal nach Inkubation des GUN4(WT) mit nativem Pflanzenextrakt. Das Coomassie-gefärbte Gel zeigt die Aufspaltung des GUN4(WT) und GUN4(S264I) in die Banden B und C. (B) und (C) *In vitro* MgCh-Assay mit AtGUN4(WT) (B) und AtGUN4(S264I) (C) vorbehandelt wie unter (A).

Um nun den Einfluss der Modifikation, die zur GUN4-Spezies in Bande C führte, auf die MgCh-Aktivität zu untersuchen, wurden die AtGUN4(WT) und AtGUN4(S264I) Proteine aus dem Kinaseassay aufgereinigt (Abbildung 3.71 A, Vergleich Abschnitt 3.11.4, S.227). Anschließend wurden äquivalente Mengen der aufgereinigten Proteine in einem *in vitro* MgCh-Assay eingesetzt (Abbildung 3.71 B und C). Wie bereits gezeigt, stimulierten die AtGUN4(WT) und AtGUN4(S264I) Proteine, die ohne Thylakoide inkubiert wurden, die rekombinante Reis MgCh um den Faktor 2-3 im Vergleich zur Kontrollreaktion ohne GUN4. Die gleiche Stimulationseffizienz wurde für die GUN4-Proteine, die mit hitzeinaktivierten Thylakoiden inkubiert wurden, beobachtet (Abbildung 3.71 B und C). Interessanterweise wurde jedoch eine verminderte Stimulation der MgCh-Reaktion durch die mit nativen Thylakoidextrakten inkubierten AtGUN4(WT) (Abbildung 3.71 A) und AtGUN4(S264I) (Abbildung 3.71 B) festgestellt (ca. 30% Reduktion im Vergleich zum nicht mit den Thylakoiden inkubierten GUN4).

In der Zusammenfassung zeigte sich somit, dass die Aufspaltung, sprich die Modifikation, von Bande B zu Bande C zu einer Abnahme der Stimulationseffizienz der MgCh führte. Somit konnte ein erster Hinweis auf die physiologische Signifikanz der zusätzlichen GUN4 Modifikation gewonnen werden.



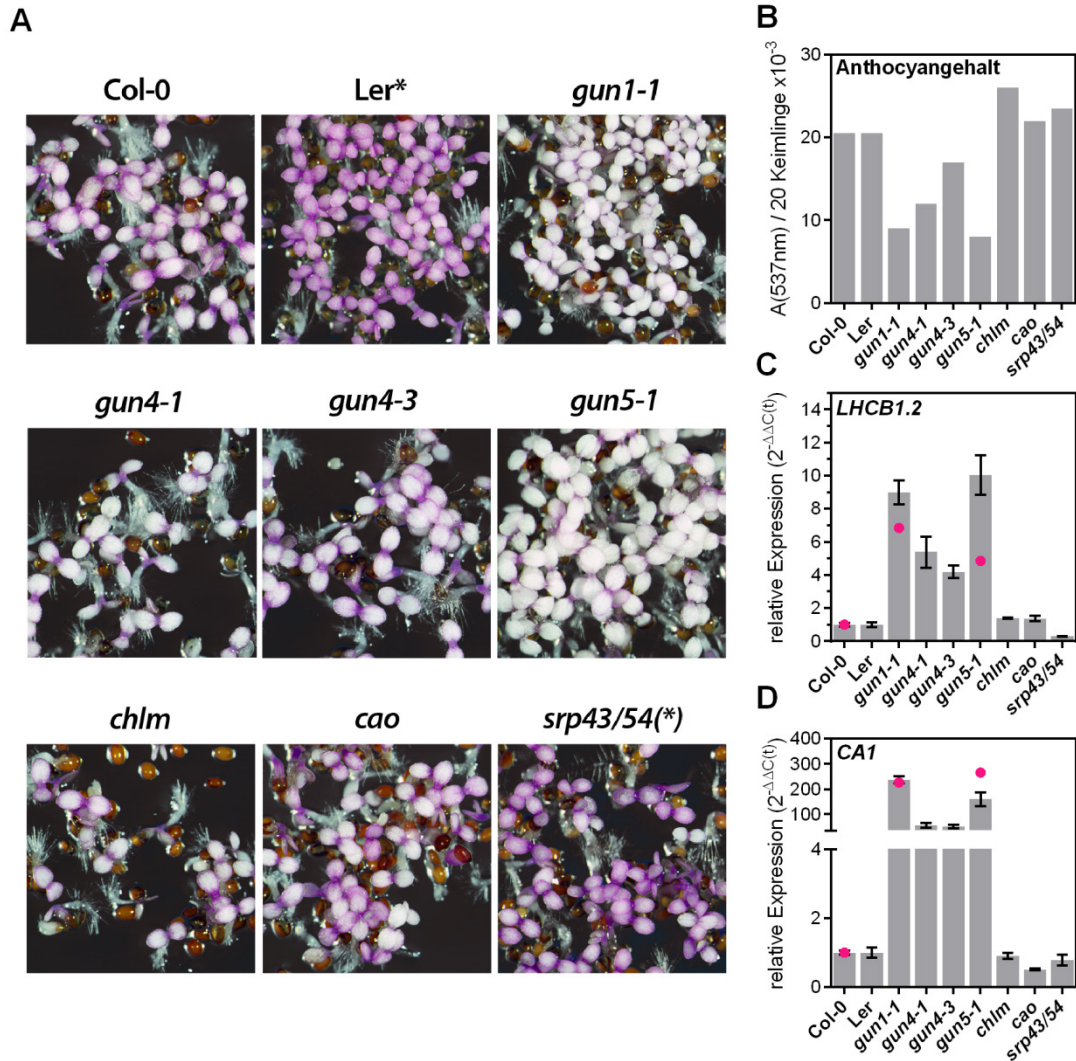
### 3.12 Untersuchungen zur retrograden Kommunikation in *gun* Mutanten

Wie in der Einleitung dargestellt (Abschnitt 1.8, S.57), ist über die Natur des retrograden Signals (RS), das dem beobachteten molekularen Phänotyp der *gun* Mutanten zugrunde liegt, bisher wenig bekannt. Während der Analysen der *gun4-2* Komplementationslinien wurde eine interessante Beobachtung gemacht, die als Ansatzpunkt für die folgenden Analysen diente.

Für eine ausführliche Beschreibung der *gun* Mutanten und den in diesen Linien beobachteten molekularen Phänotyp, sei an dieser Stelle auf die Ausführungen in der Einleitung verwiesen (Abschnitt 1.8.2, S.62).

#### 3.12.1 *gun* Mutanten zeigten eine verminderte Akkumulation von Anthocyanen nach Norflurazon-Behandlung

*Arabidopsis* WT-Pflanzen, die in Anwesenheit von Norflurazon (NF) für 4 Tage im Dauerlicht angezogen wurden, zeigten einen weißen Phänotyp mit gleichzeitiger Lilafärbung der Kotyledonen (Abbildung 3.72 A). Diese Färbung der Blätter war auf eine Anreicherung von Anthocyanen, wie sie unter Stressbedingungen (zum Beispiel Kältestress; Abschnitt 3.6.3, S.160) zu beobachten war, zurückzuführen. Im Vergleich zu den WT-Kontrollen zeigte eine *knockdown* Mutante für die MgP-Methyltransferase (*chlm*) oder *knockout* Mutanten für die CHLOROPHYLL A OXYGENASE (*cao*) und die Doppelmutante für das SIGNAL RECOGNITION PARTICLE 43/54 (*srp43/54*) eine WT-artige Akkumulation der Anthocyane nach NF-Behandlung (Abbildung 3.72 A und B). Im Gegensatz zu dieser heterogenen Mutantengruppe und den WT-Kontrollen, wurden für die zuvor publizierten *gun1-1*, *gun4-1*, *gun4-3* und *gun5-1* Mutanten eine deutlich verminderte Lilafärbung und somit reduzierte Akkumulation von Anthocyanen beobachtet (Abbildung 3.72 A und B). Auch Mutanten von *hy1* (HEME OXYGENASE, allelisch zu *gun2*), *hy2* (PHYTOCHROMOBILIN SYNTHASE, allelisch zu *gun3*) und Individuen einer *gun6* Linie (FERROCHELATASE 1 Überexpressor, Woodson et al. (2011), T. Fan, AG Prof. Grimm, HU Berlin) zeigten eine verminderte Akkumulation von Anthocyanen nach NF-Behandlung (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.72: Analyse der Anthocyanakkumulation in verschiedenen Genotypen nach Norflurazon-Behandlung (NF).**

(A) Phänotyp 4 Tage nach Keimung im Dauerlicht ( $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in Anwesenheit von NF. Die *srp43/54* Mutante wurde im Ler-Hintergrund erzeugt (\*). (B) Anthocyangehalt (gemessen als Absorption bei 537 nm) der Pflanzen aus (A). Die Daten sind als Mittelwert für 2 Proben mit 20 Keimlingen angegeben. (C) Expression von *LHCb1.2* und (D) *CA1* in den Genotypen gezeigt in (A). Die Berechnung der Expression erfolgte relativ zur NF behandelten WT-Kontrolle (Col-0) und dem Referenzgen *ACTIN2* ( $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ ). Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n=4$  gezeigt. Die farbigen Datenpunkte zeigen die relative Expression der entsprechenden Gene in Col-0, *gun1-1* und *gun5-1* nach NF-Behandlung, extrahiert aus den Rohdaten eines öffentlich zugänglichen Microarray-Experiment (Koussevitzky et al., 2007). Die *gun* Mutanten zeigten eine Korrelation zwischen *PHANG* Expression und reduzierter Anthocyanakkumulation nach NF-Behandlung.

Die Analyse der Expression zweier *PHOTOSYNTHESIS-ASSOCIATED NUCLEAR GENES* (*PHANGs*), *LHCb1.2* und *CARBOANHYDRASE 1* (*CA1*), nach NF-Behandlung, ergab folgendes Ergebnis: im Vergleich zum NF behandelten WT (Col-0 oder Ler-0), wurde für die *chlM*, *cao* und *srp43/54* Mutanten die gleiche Repression der *PHANGs* festgestellt (Abbildung 3.72 C und D). Die Störung der entsprechenden Enzymreaktionen in diesen Mutanten führte also nicht zur Entkopplung der Kerngenexpression von einem möglichen Signal, das Auskunft über den Zustand der Plastiden gab.

Daher wurden diese Mutanten als „nicht-*gun*“ Mutanten klassifiziert. Erwartungsgemäß wurde für die hier analysierten *gun* Mutanten eine stärkere Expression der *PHANGs* nach NF-Behandlung beobachtet (Abbildung 3.72 C und D). Zur unabhängigen Bestätigung der relativen Expressionsstärken zwischen Col-0, *gun1-1* und *gun5-1*, wurden Daten aus einem öffentlich zugänglichen Microarray-Experiment genutzt (Koussevitzky et al., 2007) (Abbildung 3.72 C und D, farbige Datenpunkte). Diese zeigten in etwa die Veränderungen der *LHCB1.2* und *CA1* Expression für Col-0, *gun1-1* und *gun5-1*, wie sie mit der in dieser Arbeit durchgeführten qPCR-Analyse ermittelt wurde.

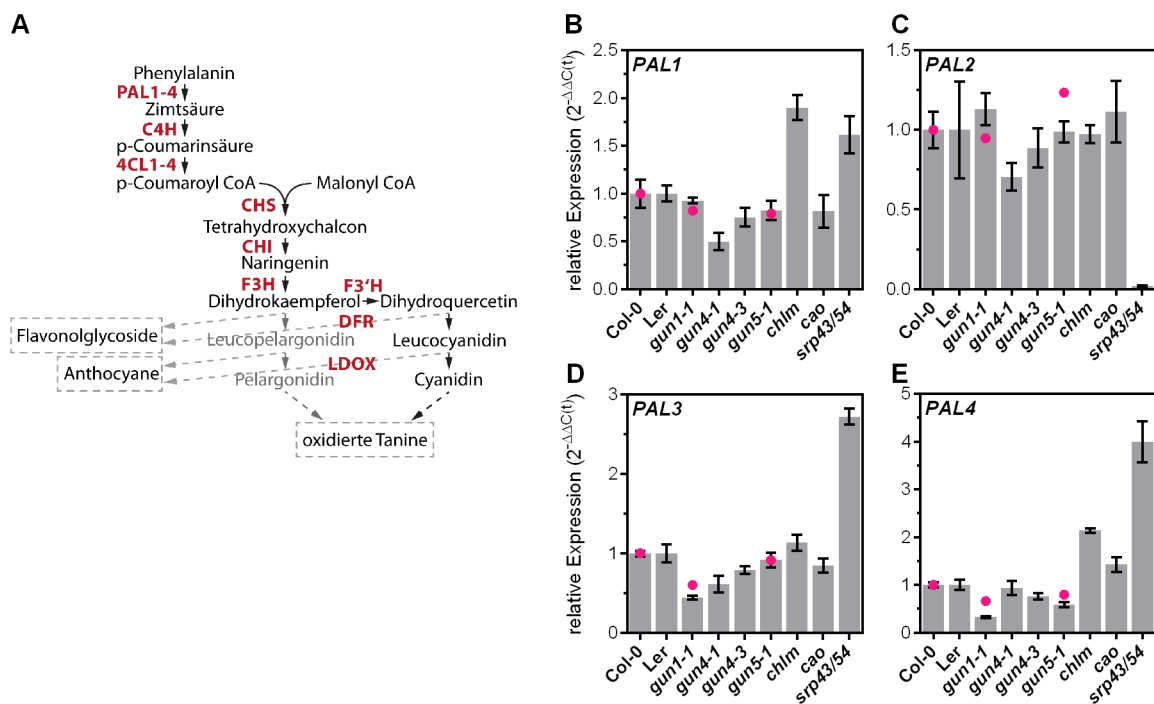
Bei der vergleichenden Analyse der Anthocyangehalte mit der Stärke der Expression von *PHANGs* nach NF-Behandlung in den verschiedenen Genotypen, ergab sich ein offensichtlicher Zusammenhang: Die Mutanten, die durch eine verminderte Akkumulation von Anthocyanen charakterisiert waren, zeigten eine stärkere *PHANG*-Expression nach NF-Behandlung (*gun* Mutanten). Genotypen, die eine erhöhte Akkumulation von Anthocyanen im Vergleich zu den *gun* Mutanten aufwiesen, reprimierten die *LHCB1.2* und *CA1* Expression nach NF-Behandlung. Innerhalb der *gun* Mutanten wurde ebenfalls beobachtet, dass die *gun1-1* und *gun5-1* Mutanten mit der geringsten Anthocyanakkumulation (40-50% WT-Gehalt) die stärkste Expression der *PHANGs* aufwiesen (*LHCB1.2*: Faktor 10 und *CA1*: Faktor 150-200 im Vergleich zum WT) (Abbildung 3.72 A-C). Die *gun4* Mutanten hingegen akkumulierten 60-70% des in den WT-Kontrollen gemessenen Anthocyangehaltes und zeigten eine geringere Akkumulation von *PHANG* Transkripten als die *gun1-1* und *gun5-1* Mutante (*LHCB1.2*: Faktor 4-6 und *CA1*: Faktor 50 im Vergleich zum WT) (Abbildung 3.72 A-C).

Diese offensichtliche Korrelation zwischen *PHANG* Expression und Anthocyanakkumulation führte zu der Vermutung, dass die Beeinflussung der Anthocyanbiosynthese spezifisch für die Gruppe der *gun* Mutanten war. Daraus ergab sich die Hypothese, dass die Beeinträchtigung der Anthocyanbiosynthese einen Einfluss auf die Regulation der *PHANG* Expression nach NF-Behandlung hatte.

Wenngleich Anthocyane nur eine Gruppe von Endprodukten der cytosolischen Phenylpropanoid- und Flavonoidbiosynthese darstellen (Abschnitt 1.9, S.70), wird im Folgenden stellvertretend der Term „Anthocyanbiosynthese“ (ABS) genutzt.

### 3.12.2 Analyse der Anthocyanbiosynthese in *gun* und nicht-*gun* Mutanten

Um die offensichtliche Störung der ABS in den *gun* Mutanten eingehender zu analysieren, wurde die Expression struktureller Gene des ABS-Weges und eine Auswahl der sie beeinflussenden Transkriptionsfaktoren analysiert. Auch die Transkripte für Enzyme, die zur Synthese der Vorläufer der Anthocyane (Phenylpropanoide) notwendig sind, wurden analysiert (Abbildung 3.73 und Abbildung 3.74). Hierfür wurden die verschiedenen Genotypen in Anwesenheit von NF für 4 Tage im Dauerlicht angezogen.



**Abbildung 3.73: Untersuchung der Expression von an der Phenylpropanoid- und Anthocyanbiosynthese beteiligten Enzymen in verschiedenen Genotypen nach NF-Behandlung.**

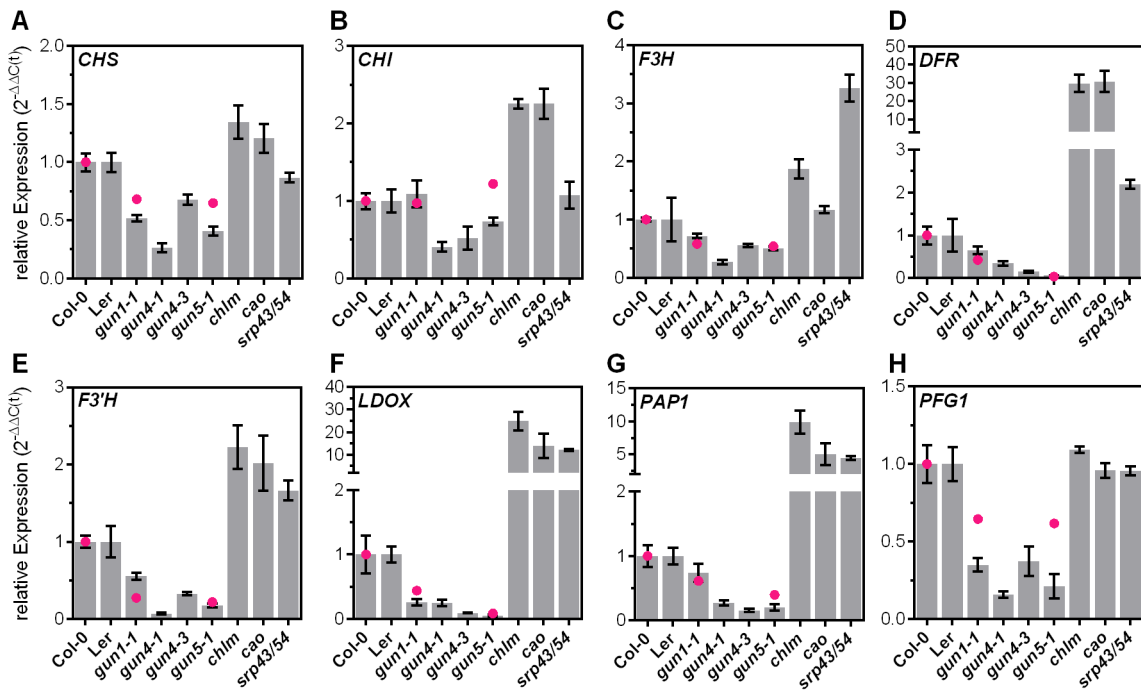
(A) Übersicht über den Anthocyanbiosyntheseweg (nach Appelhagen et al. (2014)). Die beteiligten Enzyme sind in rot dargestellt. Informationen zu den Enzymen im Text. (B-E) Expression von *PAL1-4* in den gezeigten Genotypen 4 Tage nach Keimung in Anwesenheit von NF im Dauerlicht (100  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Die Berechnung der Expression erfolgte relativ zur NF behandelten WT-Kontrolle (Col-0) und dem Referenzgen *ACTIN2* (2<sup>-ΔΔC(t)</sup>). Daten sind als Mittelwert  $\pm$ SEM für n=4 gezeigt. Die farbigen Datenpunkte zeigen die relative Expression der entsprechenden Gene in Col-0, *gun1-1* und *gun5-1* nach NF-Behandlung, extrahiert aus den Rohdaten eines öffentlich zugänglichen Microarray-Experiment (Koussevitzky et al., 2007).

Universeller Vorläufer für alle Phenylpropanoide, zu deren Derivaten die Flavonglycoside und Anthocyane selbst gehören, ist das in den Plastiden synthetisierte Phenylalanin (Abbildung 3.73 A). Dieses wird durch vier in *Arabidopsis thaliana* identifizierte PHENYLALANIN AMMONIAK LYASEN (*PAL1-4*) zur Zimtsäure umgesetzt. Die Analyse der Expression dieser *PAL* in *gun* und nicht-*gun* Mutanten ergab kein gruppenspezifisches Bild (Abbildung 3.73 B-E). Im Vergleich zur WT-Kontrolle wurde für *PAL1* in der *chl*m und *srp43/54* eine leicht erhöhte und in der *gun4-1* Mutante eine verringerte (50% WT-Gehalt) Expression beobachtet (Abbildung 3.73 C). Die verbleibenden

Genotypen zeigten eine WT-artige Expression von *PAL1*. Mit Ausnahme der *srp43/54* Mutante, wurden unveränderte *PAL2* mRNA Gehalte in den anderen Genotypen detektiert. Die *srp43/54* Mutante war durch einen fast vollständigen *knockout* der *PAL2* im Vergleich zur WT-Kontrolle (Ler-0) charakterisiert (Abbildung 3.73 C). *PAL3* wurde in der *srp43/54* Mutante um den Faktor 3 überexprimiert und lag nur zu 50% des WT-Gehaltes in der *gun1-1* Mutante vor (Abbildung 3.73 D). Die *gun1-1* Mutante wies ebenfalls eine Reduktion des *PAL4* Transkriptes auf (circa 20% WT-Gehalt). Auch die *PAL4* wurde in der *srp43/54* Mutante verstärkt exprimiert (Abbildung 3.73 E).

Die beobachteten Expressionsstärken der *PAL1-4* in Col-0, *gun1-1* und *gun5-1* waren mit den zuvor im Rahmen eines Microarray-Experimentes ermittelten relativen Verhältnissen kongruent (Koussevitzky et al., 2007). Aus besagtem Microarray-Experiment ging ebenfalls hervor, dass die *gun1-1* und *gun5-1* Mutante keine zum WT unterschiedliche Expression der sich an die PAL anschließenden Enzymschritte (CINNAMATE 4-HYDROXYLASE (*C4H*) und 4-COUMARATE:COA LIGASE (*4CL1-4*)) aufwiesen (Koussevitzky et al. (2007)).

An die Synthese der Phenylpropanoide (u.a. Zimt- und Coumarinsäure) schließt sich der Syntheseweg der Flavonoid-Derivate an (Abbildung 3.73 A). Dieser Abschnitt der ABS wird durch die CHALCON SYNTHASE (*CHS*) eingeleitet und setzt sich in der Umwandlung der Intermediate durch weitere Enzyme fort (Abschnitt 1.9.1, S.70).



**Abbildung 3.74: Weitere Analyse der Expression von an der Phenylpropanoid- und Anthocyanbiosynthese beteiligten Enzymen und Transkriptionsfaktoren in verschiedenen Genotypen nach NF-Behandlung.**

Analysiert wurde die Expression von (A) *CHS*, (B) *CHI*, (C) *F3H*, (D) *DFR*, (E) *F3'H*, (F) *LDOX* sowie von den Transkriptionsfaktoren *PAP1* (G) und *PFG1* (H) in den gezeigten Genotypen 4 Tage nach Keimung in Anwesenheit von NF im Dauerlicht (100  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Informationen zu den Genprodukten im Text. Die Berechnung der Expression erfolgte relativ zur NF behandelten WT-Kontrolle (Col-0) und dem Referenzgen *ACTIN2* (2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub>(t)</sup>). Daten sind als Mittelwert  $\pm$ SEM für n=4 gezeigt. Die farbigen Datenpunkte zeigen die relative Expression der entsprechenden Gene in Col-0, *gun1-1* und *gun5-1* nach NF-Behandlung, extrahiert aus den Rohdaten eines öffentlich zugänglichen Microarray-Experiments (Koussevitzky et al., 2007).

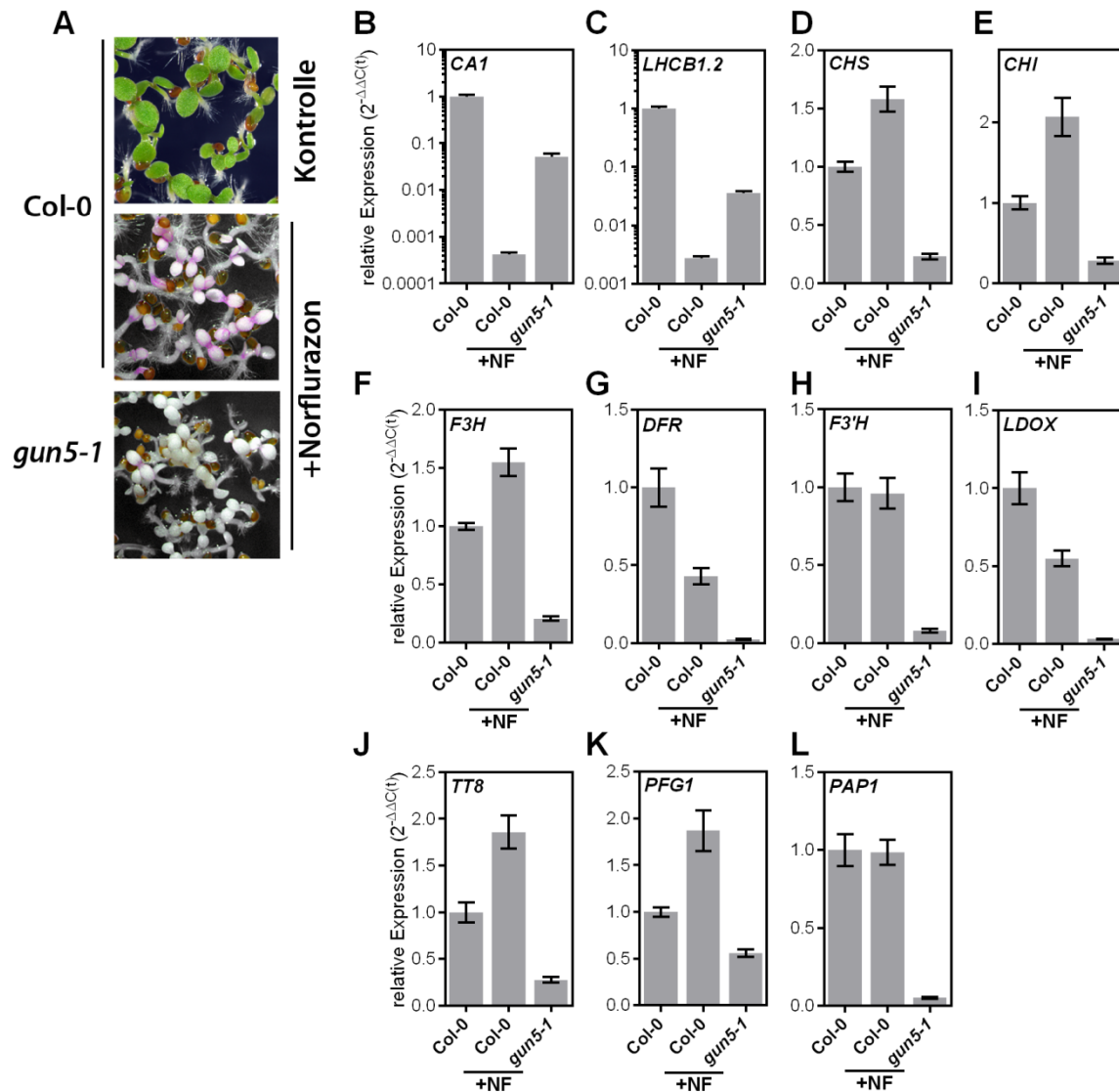
Aus der Analyse der für diese Genprodukte kodierenden Transkripte (Abbildung 3.74), ergab sich ein interessanter Befund: Mit Ausnahme der *CHI* lagen alle analysierten Transkripte von Genen, die zur Synthese von Anthocyanen notwendig sind, in den *gun* Mutanten in deutlich reduzierten Mengen vor (Abbildung 3.74 A-F). In den nicht-*gun* Mutanten waren diese Transkriptgehalte nicht verändert oder wurden stärker als in den WT-Kontrollen exprimiert. Für das *CHS* Transkript wurde in den *gun* Mutanten eine mindestens 50%ige Reduktion relativ zu den Kontrolllinien beobachtet (Abbildung 3.74 A). Auch Transkripte der „späten“ strukturellen Gene der ABS (*DFR* und *LDOX*) wurden in deutlich verringerten Gehalten in den *gun* Mutanten detektiert (Abbildung 3.74 E und F). Zwei Transkriptionsfaktoren (PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT 1 (*PAP1*) und PRODUCTION OF FLAVONOL GLYCOSIDES 1 (*PFG1*)), die zur Steuerung der Expression der zuvor analysierten strukturellen ABS Gene notwendig sind, zeigten ebenfalls eine deutlich reduzierte Expression in den *gun* Mutanten (10-40% WT-Gehalt, Abbildung 3.74 G und H). Im Gegensatz dazu wurde *PAP1* in den nicht-*gun* Mutanten 5-10fach stärker, als in dem zugehörigen WT exprimiert (Faktor 5-10) (Abbildung 3.74 G). Dieser Befund war mit der verstärkten Expression von *DFR* und *LDOX* in den nicht-*gun* Mutanten in Einklang zu bringen, da deren Expression durch *PAP1* gesteuert wird (Abschnitt 1.9.2, S.72), (Abbildung 3.74 D und F).

Auch hier stimmten die relativen Expressionsverhältnisse der analysierten Gene in Col-0, *gun1-1* und *gun5-1* mit den Resultaten von Koussevitzky et al. (2007) fast vollständig überein.

Zusammengefasst kann die in den *gun* Mutanten beobachtete Beeinträchtigung der ABS durch die verminderte Expression der strukturellen ABS Gene erklärt werden. Dabei ist jedoch wichtig zu betonen, dass die initialen Schritte des Phenylpropanoid-Syntheseweges (PAL, C4H, 4CL) in den *gun* Mutanten, zumindest auf der Ebene der Transkription, nicht beeinflusst waren.

### **3.12.3 Untersuchung der Anthocyanbiosynthese in An- und Abwesenheit von Norflurazon**

Die beobachtete Akkumulation von Anthocyanen in NF behandelten WT-Pflanzen ließ vermuten, dass die Anreicherung von Anthocyanen im Zuge einer Stressantwort erfolgte, deren Ausprägung in den *gun* Mutanten vermindert war. Dabei war zunächst unklar welchen Einfluss die NF-Behandlung auf die Expression der ABS-Gene im Vergleich zu einer nicht gestressten Pflanze/Situation hatte. Diese Fragestellung wurde im Rahmen eines Vergleiches von Col-0 Pflanzen, die in An- oder Abwesenheit von NF angezogen wurden, eingehender studiert (Abbildung 3.75). Als Kontrolle für einen Genotyp, der eine verminderte Expression der ABS-Gene nach NF-Behandlung zeigte, wurde die *gun5-1* Linie mitgeführt.



**Abbildung 3.75: Untersuchung der Expression von an der Anthocyanbiosynthese beteiligten Enzymen und Transkriptionsfaktoren in Col-0 und *gun5* nach NF-Behandlung.**

(A) Phänotyp von WT-Pflanzen (Col-0) angezogen für 4 Tage im Dauerlicht ( $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in An- (+Norflurazon) und Abwesenheit (Kontrolle) von NF. Zusätzlich ist die *gun5-1* Mutante nach NF-Behandlung gezeigt. (B-L) Expressionsanalyse der *PHANGs*. (B) *CA1*, (C) *LHCB1.2*, sowie der Anthocyanbiosynthese-Enzyme (D) *CHS*, (E) *CHI*, (F) *F3H*, (G) *DFR*, (H) *F3'H*, (I) *LDOX* und von den Transkriptionsfaktoren *TT8* (J), *PFG1* (K) und *PAP1* (L). Die Berechnung der Expression erfolgte relativ zur NF behandelten WT-Kontrolle (Col-0) und dem Referenzgen *ACTIN2* ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ). Daten sind als Mittelwert  $\pm$ SEM für  $n=4$  gezeigt. Während die Expression der *PHANGs* reprimiert wurde, wurden Teile der Anthocyanbiosynthese-Gene im WT nach NF-Behandlung induziert. Die *gun5* Mutante zeigte hingegen eine stark reduzierte Expression der Anthocyanbiosynthese-Gene nach NF-Behandlung.

Im Gegensatz zur Anzucht ohne NF, führte die NF-Behandlung des WT zur Ausprägung eines weißen Phänotyps mit einer für die Anthocyanakkumulation charakteristische Lilafärbung der Kotyledonen. Diese war in den *gun5-1* Mutanten nicht zu beobachten (Abbildung 3.75 A). Im direkten Vergleich von Col-0 Pflanzen, angezogen mit und ohne NF, zeigte sich eine deutliche Hemmung der *PHANG* Expression nach NF-Behandlung. Die *CA1*-Expression wurde im WT durch die NF-Behandlung um den Faktor 2000, die *LHCB1.2* Expression um den Faktor 400 reduziert (Abbildung 3.75 B und C). In der NF behandelten *gun5-1* Mutante hingegen wurde die Expression dieser *PHANGs* im Vergleich zum WT



ohne NF lediglich um den Faktor 10 (*CA1*), bzw. Faktor 20 (*LHCB1.2*) vermindert (Abbildung 3.75 B und C).

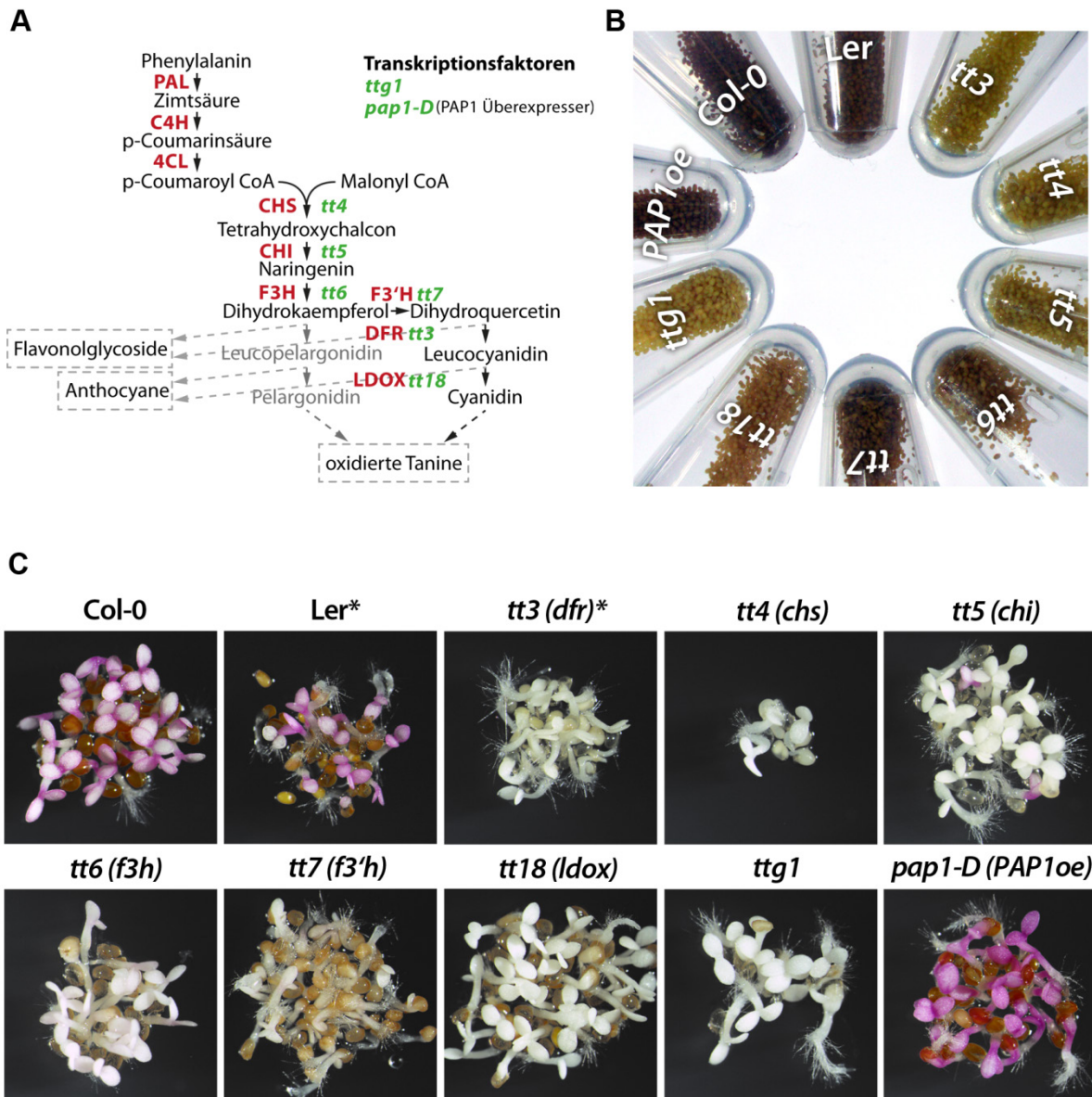
Insbesondere die „frühen“ Gene der ABS (*CHS*, *CHI*, *F3H*, Abbildung 3.75 D-F) wurden durch die NF-Behandlung im WT induziert. Bedingt wurde die verstärkte Genexpression unter anderem durch die erhöhte Expression der Transkriptionsfaktoren *PFG1* und *TT8* (*TRANSPARENTA TESTA 8*) (Abbildung 3.75 J und K). Die Transkripte der „späten“ ABS-Gene lagen unter den gleichen Bedingungen in reduzierten (*DFR* und *LDOX*, Abbildung 3.75 G und I) oder unveränderten (*F3'H*, Abbildung 3.75 H) Mengen vor. Trotz erhöhter *PHANG* Expression zeigte die *gun5-1* Mutante im Zuge der NF-Behandlung eine drastische Reduktion aller analysierten ABS-Gene im Vergleich zum WT mit und ohne NF-Behandlung (Abbildung 3.75 B-L).

Wie vermutet zeigte sich also, dass die deutliche Akkumulation von Anthocyanen im WT nach NF-Behandlung durch eine Induktion der (frühen) Schritte der ABS bedingt wurde. Diese, als Stressantwort zu betrachtende Reaktion, blieb in den analysierten *gun* Mutanten aus. Die Anreicherung von Anthocyanen korrelierte negativ mit der Stärke der Expression von *PHANGs* nach NF-Behandlung.

#### 3.12.4 Untersuchung von Anthocyanbiosynthese Mutanten

Die zuvor dargestellten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Anreicherung von Anthocyanen einen Einfluss auf den retrograden Signalweg (RS) hatte. Diese Annahme sollte durch die Untersuchung des RS in anthocyandefizienten Mutanten geprüft werden. Hierfür wurde ein Set von sogenannten *transparent testa* (*tt*) Mutanten genutzt (Abschnitt 1.9, S.70). Diese Mutanten mit veränderter ABS wurden von Prof. S. Rothstein (University of Guelph, Kanada) zur Verfügung gestellt (Abbildung 3.76).

Die in den *tt* Mutanten beeinflussten Gene, bzw. deren Genprodukte, sind in Abbildung 3.76 A gezeigt. Es wurden sowohl Mutanten der „frühen“ (*tt4*, 5, 6) als auch „späten“ (*tt7*, 3, 18) ABS Schritte analysiert. Zusätzlich wurde eine Mutante für einen weiteren Transkriptionsfaktor der ABS, *TTG1* (*TRANSPARENT TESTA GLABRA*), und eine Überexpressionslinie für *PAP1* einbezogen. *TTG1* hat durch die Beeinflussung der Expression von anderen ABS-Transkriptionsfaktoren eine zentrale Funktion in der Regulation der ABS-Gene (Abschnitt 1.9.2, S.72). Neben Anthocyanen werden auch oxidierte Tanine über die Flavonoidbiosynthese erzeugt. Diese werden in die Samenschale eingelagert. Daher war das Saatgut aller *tt* Mutanten (auch *ttg1*) im Vergleich zum WT-Saatgut deutlich heller. Dies wiederum lies auf eine eindeutige Beeinflussung der ABS (bzw. Flavonoidbiosynthese) durch die entsprechenden Mutationen ließ (Abbildung 3.76 B).



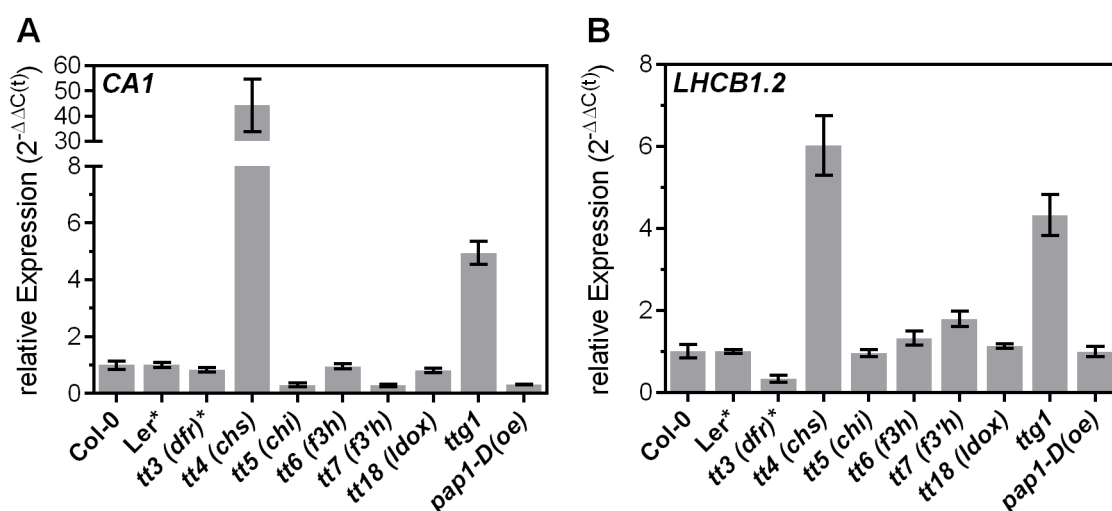
**Abbildung 3.76: Analyse von *transparent testa* (*tt*) Mutanten.**

(A) Übersicht über den Anthocyanbiosyntheseweg (nach Appelhagen et al. (2014)). Die beteiligten Enzyme sind in rot, die entsprechenden Mutanten in grün dargestellt. Informationen zu den Enzymen im Text. (B) Phänotyp des Saatguts von *tt* Mutanten. (C) Phänotyp von WT-Pflanzen (Col-0 und Ler) und *tt* Mutanten 4 Tage nach Keimung im Dauerlicht ( $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in Anwesenheit von NF. Mit Ausnahme der PAP1-Überexpressionslinie (*pap1-D* bzw. PAP1oe) akkumulierten die *tt* Mutanten keine Anthocyane nach NF-Behandlung.

Die Anthocyandefizienz der *tt/ttg* Mutanten bestätigte sich mit der Anzucht der Linien in Anwesenheit von NF. Im Vergleich zu den WT-Linien wiesen alle *tt/ttg* Mutanten unter diesen Bedingungen weiße Kotyledonen auf (Abbildung 3.76 C). Die PAP1 Überexpressorlinie (*pap1-D*) hingegen zeigte sogar eine intensivere Lilafärbung der Keimlinge, was auf eine erhöhte Produktion von Anthocyanen im Vergleich zum WT schließen ließ. Nachdem somit die wichtigste Voraussetzung für die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Anthocyanakkumulation und RS erfüllt war, wurde die Expression der *CA1* und *LHCB1.2* untersucht (Abbildung 3.77). Dabei zeigte sich, dass fast alle analysierten Mutanten (*tt3*, *5*, *6*, *7*, *18* und *pap1-D*) im Vergleich zum WT nach NF-Behandlung

keine veränderte Expression der *PHANGs* aufwiesen (Abbildung 3.77 A und B) und folglich keine Störung des RS vorlag.

Erstaunlicherweise wurden jedoch zwei Mutanten mit veränderter *PHANG* Expression beobachtet. Die *tt4* Mutante, die ein *knockout* der *CHALCON SYNTHASE* (*CHS*) war, zeigte nach NF-Behandlung eine deutliche erhöhte Expression von *CA1* und *LHCB1.2* im Vergleich zum NF behandelten WT (Abbildung 3.77 A und B). Der Grad der *CA1* Expression (Faktor 50 im Vergleich zum WT) und des *LHCB1.2* (Faktor 6 im Vergleich zum WT) in der *tt4* Mutante lag dabei in einem Bereich, der zuvor für die *gun4* Mutanten detektiert wurde (Vergleich Abschnitt 3.12.1, S.237). Wenngleich die Stärke der Expression der *PHANGs* unter denen der *tt4* und anderen *gun* Mutanten lag, zeigte auch die *ttg1* Mutante eine Veränderung im RS (Abbildung 3.77 A und B). Somit konnten innerhalb des hier analysierten Sets von ABS-Mutanten zwei Mutanten isoliert werden, die die gleichen Charakteristika wie die *gun* Mutanten aufwiesen.



**Abbildung 3.77: Analyse der Expression von *PHANGs* in *tt* Mutanten nach NF-Behandlung.**

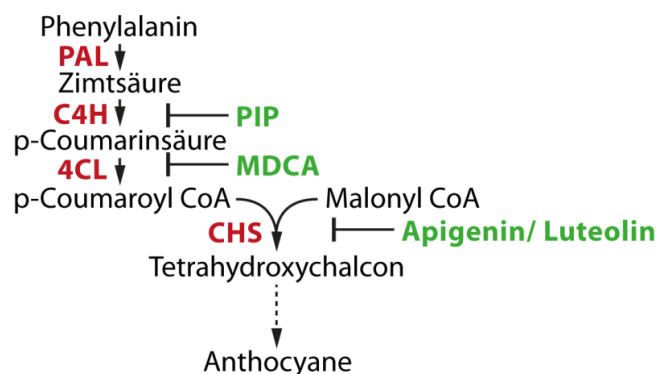
Expression von (A) *CA1*, (B) *LHCB1.2* in *tt* Mutanten angezogen für 4 Tage im Dauerlicht ( $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in Anwesenheit von Norflurazon. Die Berechnung der Expression erfolgte relativ zur NF behandelten WT-Kontrolle (Col-0, bzw. Ler für *tt3*(\*)) und dem Referenzgen *ACTIN2* ( $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ ). Daten sind als Mittelwert  $\pm$ SEM für  $n=4$  gezeigt. Die *tt4* und *ttg1* Mutanten zeigen eine stärkere *PHANG* Expression und wurden daher als *gun* Mutanten zu klassifizierten.

Es kann festgehalten werden, dass die Anthocyane als Endprodukte der Flavonoidsynthese keinen direkten Einfluss auf die Expression der *PHANGs* nahmen. Vielmehr konnte vermutet werden, dass der *knockout* der *CHS* (*tt4*) zur Veränderung im RS führte. Auch die verminderte Expression der ABS-Gene in der *ttg1* Mutante führten zu einem partiellen *gun* Phänotyp.

### 3.12.5 Analyse des RS unter Hemmung der Anthocyanbiosynthese

In der Annahme, dass das *CHS* Transkript selbst keinen Einfluss hatte, wurde eine metabolische Komponente vermutet, die die Deregulation der *PHANG* Expression in der *tt4*, aber auch in den *gun* Mutanten, bewirkte.

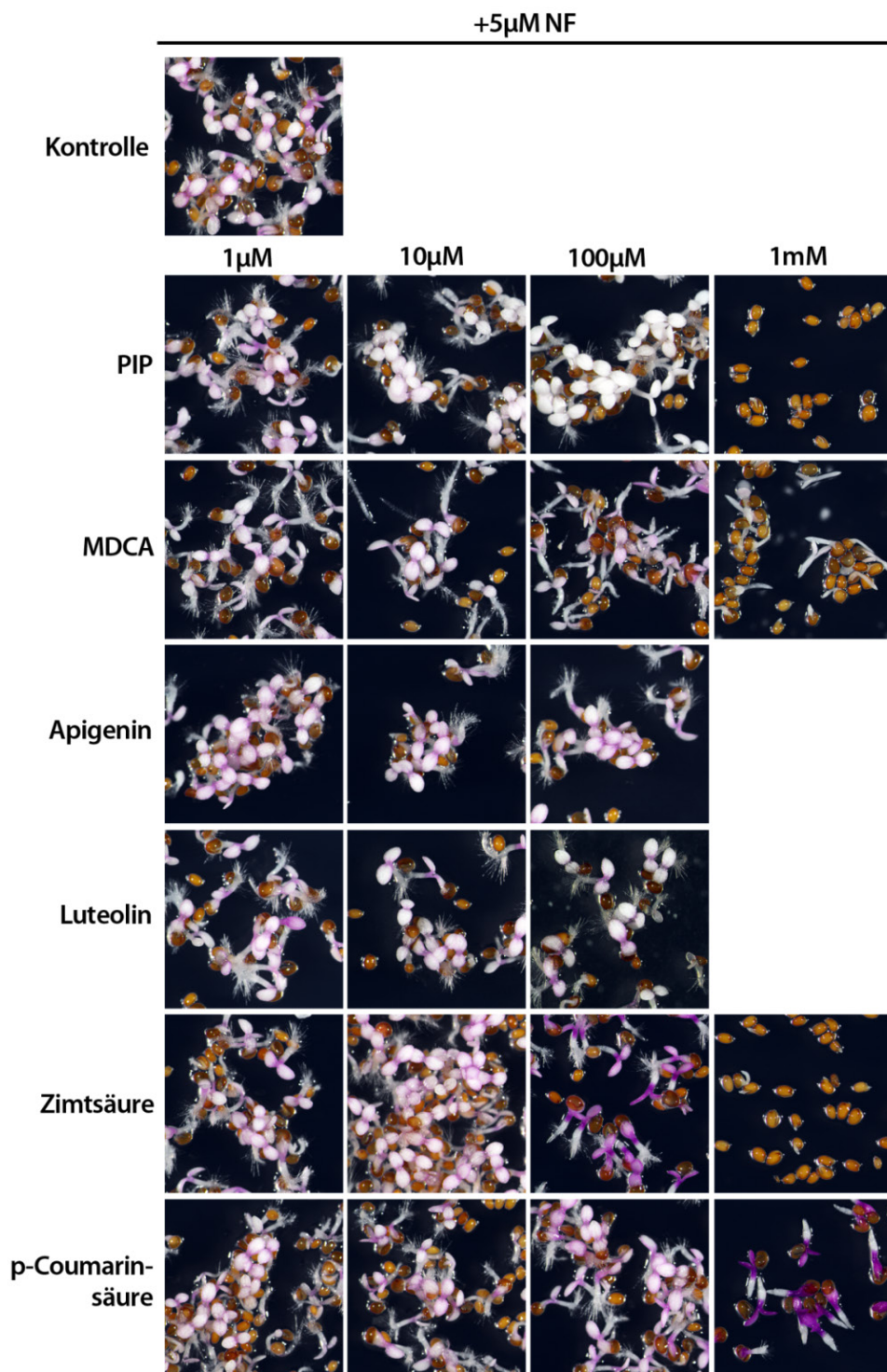
Daher wurden in einem nachfolgenden Experiment einzelne Enzyme des Phenylpropanoid-/Flavonoidbiosyntheseweges durch Chemikalien inhibiert (Abbildung 3.78). Zusätzlich sollte durch Fütterung überprüft werden, ob eine der Vorstufen der CHS einen Einfluss auf den RS-Weg nehmen kann.



**Abbildung 3.78:** Übersicht über die frühen Schritte des Anthocyanbiosyntheseweges und eingesetzte Hemmstoffe.

Hervorgehoben sind Chemikalien (grün), die eine Hemmung der Enzyme (rot) bewirken sollen. PIP, Piperonylsäure; MDCA, 3,4-(Methylenedioxy) cinnamic acid.

Zur Hemmung der CINNAMATE 4-HYDROXYLASE (C4H) wurde Piperonylsäure (PIP) eingesetzt. Die Hemmung der 4-COUMARATE:COA LIGASE (4CL) sollte mit 3,4-(Methylenedioxy) cinnamic acid (MDCA) erzielt werden. Die Reaktion der CHS sollte mit Apigenin (4',5,7-Trihydroxyflavon) und Luteolin (3',4',5,7-Tetrahydroxyflavon) gehemmt werden (Abbildung 3.78). Zusätzlich erfolgte eine Fütterung mit Zimtsäure und p-Coumarinsäure. Die Hemmstoffe und Vorstufen wurden in Anwesenheit einer konstanten Menge NF in unterschiedlichen Konzentrationen dem Nährmedium hinzugefügt. In diesem Experiment wurde ausschließlich die Reaktion des *At Col-0* WT auf die verschiedenen Behandlungen untersucht (Abbildung 3.79).



**Abbildung 3.79: Manipulation des Anthocyanbiosyntheseweges in Norflurazon (NF)-behandelten Col-0 Pflanzen.**

Die Pflanzen wurden für 4 Tage im Dauerlicht ( $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in Anwesenheit von  $5 \mu\text{M}$  NF und unterschiedlichen Konzentrationen von Hemmstoffen bzw. Intermediaten des Anthocyanbiosyntheseweges angezogen. Eine Hemmung der Anthocyanbiosynthese sollte mit PIP (C4H), MDCA (4CL), Apigenin und Luteolin (CHS), herbeigeführt werden. Zusätzlich wurden die Pflanzen mit Zimtsäure und p-Coumarinsäure behandelt.

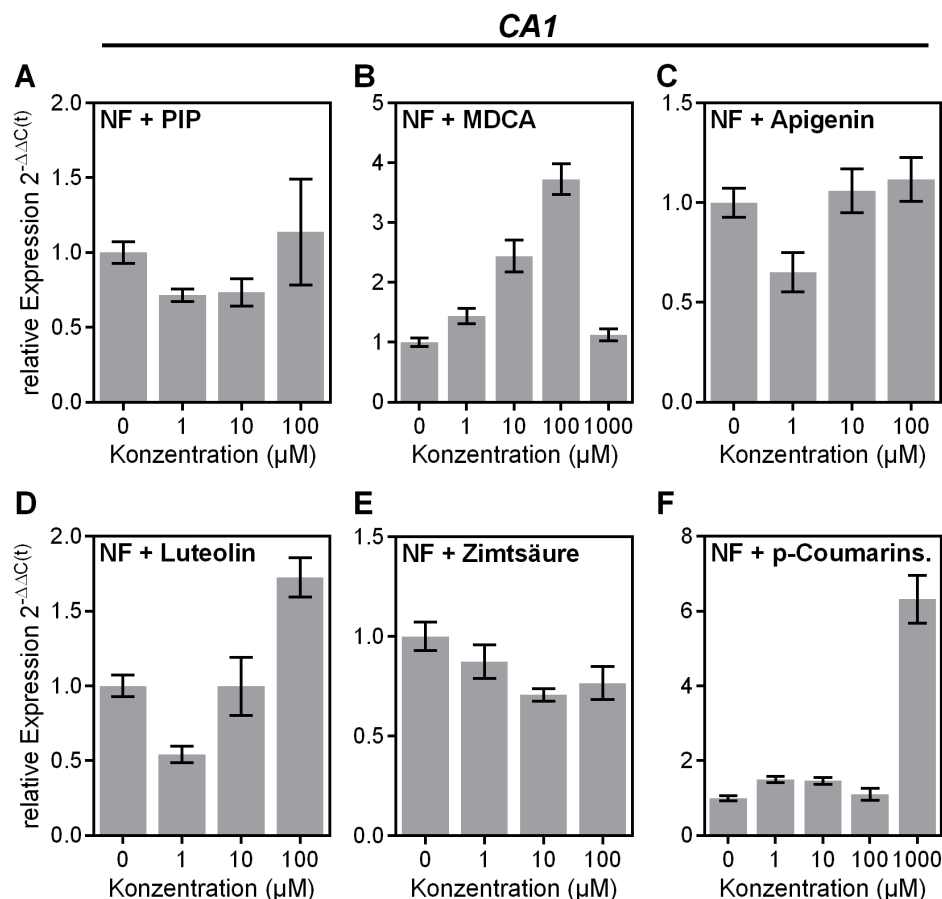
Bis zu einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  hatten die verwendeten Hemmstoffe und Intermediate nur einen geringen Einfluss auf die Keimung und das Wachstum der Col-0 Keimlinge. Für PIP, MDCA und Zimtsäure wurde eine stark beeinträchtigte Keimung bei einer Konzentration von  $1 \text{ mM}$  beobachtet

(Abbildung 3.79). Der Erfolg der Hemmung der Enzymschritte durch die entsprechenden Chemikalien war unterschiedlich. In Anwesenheit von NF bewirkten MDCA, Apigenin und Luteolin keine deutliche Verminderung der Anthocyanakkumulation im Vergleich zum nur mit NF behandelten WT. Die Anwendung von PIP führte zu einer deutlichen Reduktion der akkumulierenden Anthocyane im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 3.79). PIP entfaltete seine hemmende Wirkung bereits ab einer Konzentration von 10  $\mu$ M und führte zu vollständig weißen Kotyledonen bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M in Anwesenheit von NF, vergleichbar zu den *tt* Mutanten (Vergleich Abschnitt 3.12.4, S.245).

Die Fütterung von Zimtsäure führte ab einer Konzentration von 100  $\mu$ M zu einer deutlichen Anreicherung von Anthocyanen. Für p-Coumarinsäure hingegen wurde dies erst ab einer Konzentration von 1 mM beobachtet (Abbildung 3.79).

Die Analyse der Expression der *PHANGs* in den mit NF und den oben genannten Chemikalien behandelten Col-0 WT-Pflanzen zeigte, dass PIP, Apigenin, Luteolin und Zimtsäure gemittelt über alle verwendeten Konzentrationen, keinen deutlichen Einfluss auf die Expression von *CA1* hatten (Abbildung 3.80 A, C, E). Für Zimtsäure konnte eine leichte, graduelle Abnahme der *CA1* Expression detektiert werden (bis zu -20% im Vergleich zu nur NF) (Abbildung 3.80 E).





**Abbildung 3.80: Analyse der Expression von CA1 in Norflurazon (NF)-behandelten Col-0 Pflanzen.**

Die Pflanzen wurden für 4 Tage im Dauerlicht ( $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in Anwesenheit von  $5 \mu\text{M}$  NF und unterschiedlichen Konzentrationen von Hemmstoffen sowie Intermediaten des Anthocyanbiosyntheseweges angezogen: (A) NF+PIP, (B) NF+MDCA, (C) NF+Apigenin, (D) NF+Luteolin, (E) NF+Zimtsäure, (F) NF+p-Coumarinsäure. Die Berechnung der Expression erfolgte relativ zu nur mit NF behandelten Col-0 Pflanzen und dem Referenzgen *ACTIN2* ( $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ ). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM für  $n=4$  gezeigt. Die Hemmung der 4CL mittels MDCA sowie die Behandlung mit p-Coumarinsäure (die Vorstufe der 4CL-Reaktion) führten zu einer *gun* ähnlichen Entkopplung der CA1 Expression in NF behandelten WT-Pflanzen.

Die Hemmung der CHS durch  $100 \mu\text{M}$  Luteolin führte zu einem Anstieg der CA1 Expression von +75% gegenüber den nur mit NF behandelten WT-Pflanzen (Abbildung 3.80 D). Durch die Hemmung der 4CL mit MDCA wurde eine konzentrationsabhängige Zunahme der CA1 Expression beobachtet. Mit zunehmender Konzentration von MDCA nahm ebenfalls die Expression der CA1 zu (Abbildung 3.80 B). Auch die Fütterung von p-Coumarinsäure führte in einer Konzentration von  $1 \text{ mM}$  zu einer 6-7fach erhöhten Expression der CA1 mRNA im Vergleich zum nur mit NF behandelten WT (Abbildung 3.80 F).

Die für die CA1 beschriebenen Effekte wurden in abgeschwächter Form auch für die *LHCB1.2* mRNA beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Basierend auf den zuvor gezeigten Ergebnissen kann festgehalten werden, dass die Hemmung der Akkumulation von Anthocyanen, durch die chemische Inhibierung der C4H mittels PIP, keinen

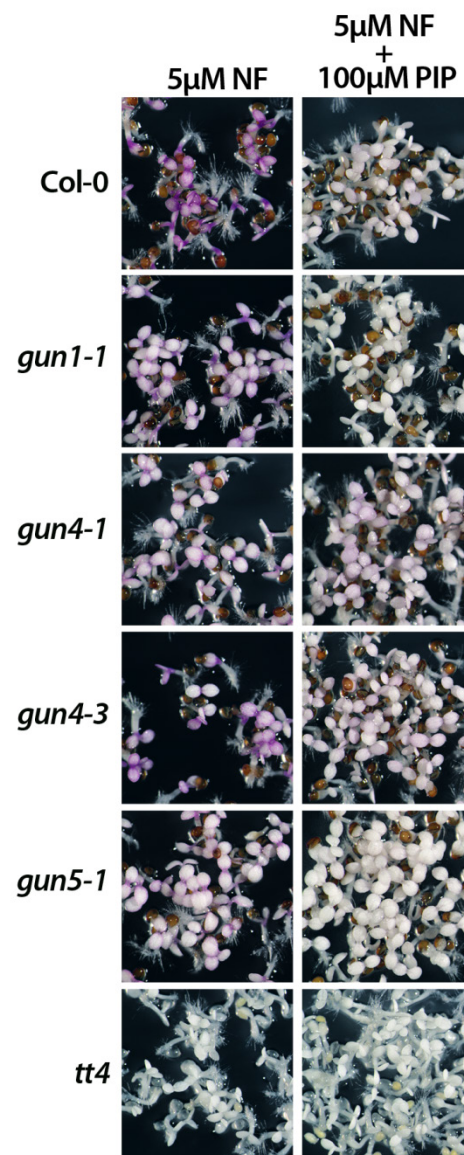
Einfluss auf die Akkumulation von *PHANG* Transkripten hatte. Ferner führte die Hemmung der 4CL durch MDCA, sowie die Fütterung von p-Coumarinsäure, der Vorstufe der 4CL, zu einer verstärkten Expression von *PHANGs* in Anwesenheit von NF. Es konnte eine erhöhte *PHANG*-Expression nach NF-Behandlung durch den zusätzlichen chemischen Eingriff in die ABS erzielt werden. Folglich könnte angenommen werden, dass die Anreicherung von p-Coumarinsäure zur Simulation des molekularen *gun* Phänotyps in *At* WT-Pflanzen führen.

### **3.12.6 Umkehrung des molekularen *gun* Phänotyps in *gun* Mutanten**

Aus dem zuvor gezeigten Experiment ging hervor, dass eine Vorstufe des Flavonoidbiosyntheseweges einen Einfluss auf die *PHANG* Expression hatte. Im Zusammenhang mit der beobachteten Einschränkung der ABS in den *gun* Mutanten (Abbildung 3.72, Abbildung 3.73, Abbildung 3.74) und der Isolation der *tt4* (*chs*) Mutante als neue *gun* Mutante (Abbildung 3.77) ergab sich folgende Theorie: sowohl in den *gun* Mutanten, als auch in der *tt4* Mutante, reicherte sich die besagte Vorstufe an und führt somit zur Entkopplung der *PHANG* Expression in diesen Mutanten. Im Umkehrschluss sollte daher die Einschränkung der Akkumulation dieser Vorstufe (in Anwesenheit von NF) zu einer Umkehrung des *gun* Phänotyps in den *gun* Mutanten führen. Mit anderen Worten sollte das im Folgenden gezeigte Experiment einen Hinweis geben, ob das durch die GUN-Proteine beeinflusste RS durch ein cytosolisches Intermediat des Phenylpropanoidweges bewirkt oder vermittelt wird.

Wie das Experiment zu den Hemmstoffen der ABS zeigte, führte die Hemmung der C4H durch 100 µM PIP zu einer Verringerung der Anthocyangehalte in Anwesenheit von NF (Abbildung 3.79). PIP hemmte folglich den Fluss von Vorstufen in die Phenylpropanoid-/ Flavonoidbiosynthese. Die Anwesenheit von PIP hatte dabei keinen Einfluss auf die Expression der *PHANGs* im NF-behandelten WT (Abbildung 3.80 A).

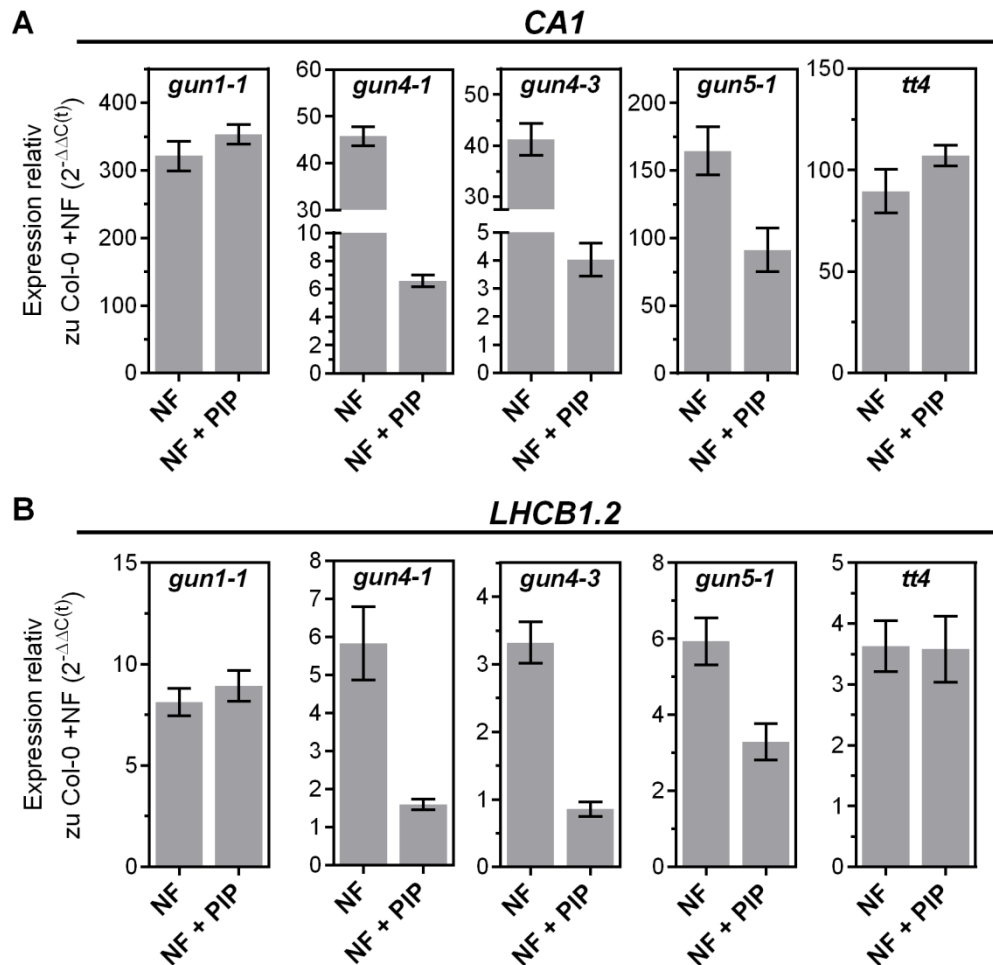




**Abbildung 3.81: Phänotyp von *gun* und *tt4* Mutanten nach Behandlung mit Norflurazon (+NF) und gleichzeitiger Hemmung der C4H mittels PIP (NF+PIP).**

Die Pflanzen wurden für 4 Tage im Dauerlicht ( $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in Anwesenheit von  $5 \mu\text{M}$  NF oder  $5 \mu\text{M}$  NF und  $100 \mu\text{M}$  PIP angezogen. PIP reduzierte die Akkumulation von Anthocyanen nach NF-Behandlung.

Die in Abbildung 3.81 gezeigten Genotypen wurden in Anwesenheit einer konstanten Menge NF und in An- oder Abwesenheit von PIP angezogen. Nach NF-Behandlung reicherten die *gun1-1*, *gun4-1*, *gun4-3*, *gun5-1* und *tt4* Mutante weniger Anthocyane als die WT-Pflanzen an (Abbildung 3.81). Die zusätzliche Hemmung der C4H durch PIP führte in den Mutanten, aber auch im Col-0, zu einer deutlichen Abnahme der Anthocyangehalte im Vergleich zur NF-Behandlung allein. Der gleichzeitig mit NF und PIP behandelte WT zeigte eine ähnlich weiße Färbung der Kotyledonen, wie sie für die *gun* Mutanten nach NF+PIP- Behandlung beobachtet wurde (Abbildung 3.81).



**Abbildung 3.82: Analyse der Expression der PHANGs CA1 (A) und LHCB1.2 (B) in *gun* und *tt4* Mutanten nach Behandlung mit NF allein oder in Kombination mit PIP.**

Die Pflanzen wurden für 4 Tage im Dauerlicht ( $100 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in Anwesenheit von  $5 \mu\text{M}$  Norflurazon (NF) oder  $5 \mu\text{M}$  NF und  $100 \mu\text{M}$  PIP (NF+PIP) angezogen. Die Berechnung der Expression erfolgte relativ zur NF behandelten WT-Kontrolle (=1, nicht gezeigt) und dem Referenzgen *ACTIN2* ( $2^{-\Delta\Delta C(t)}$ ). Daten sind als Mittelwert  $\pm$ SEM für  $n=4$  gezeigt. Die Verhinderung der Akkumulation von Anthocyanvorstufen durch PIP in Anwesenheit von NF, führte zu einer deutlichen Reduktion der Entkopplung der PHANGs in *gun4* und *gun5* Mutanten.

Erwartungsgemäß führte die NF-Behandlung in den *gun* und *tt4* Mutanten im Vergleich zum WT zu einer erhöhten Expression von *CA1* und *LHCB1.2* (Abbildung 3.82 A und B). Erstaunlicherweise wurden die formulierten Erwartungen bezüglich des Einflusses von PIP auf die PHANG Expression ebenfalls bestätigt: sowohl die *gun4-1*, *gun4-3* als auch die *gun5-1* Mutante zeigten nach der Anzucht in Anwesenheit von NF und PIP eine im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit NF veränderte PHANG Expression (Abbildung 3.82 A und B). So reduzierte sich die Expression der *CA1* nach NF+PIP-Behandlung in den *gun4* und *gun5-1* Mutanten relativ zum NF-behandelten WT. Im Vergleich zur Anwesenheit von NF allein reduzierte sich die Expression von *CA1* nach NF+PIP-Behandlung um den Faktor 10 (*gun4-1* und *gun4-3*) und 2 (*gun5-1*). Für die *LHCB1.2* Expression wurde in diesen Mutanten ebenfalls eine Reduktion nach NF+PIP-Behandlung im Vergleich zu NF alleine beobachtet, wobei die beiden *gun4* Mutanten WT-gleiche *LHCB1.2* mRNA-Gehalte akkumulierten (Abbildung 3.82 B, WT NF=1). Die *gun5-1* Mutante bildete nach NF+PIP nur noch circa 2,5fach mehr *LHCB1.2* Transkript als

der NF-behandelte WT (Abbildung 3.82 B). Im Gegensatz zu den Mutanten, die im Schritt der MgCh der TBS beeinträchtigt waren, zeigten die *gun1-1* und *tt4* Mutanten keine Reaktion auf PIP. In Anwesenheit von NF und PIP veränderte sich die *PHANG* Expression in der *gun1-1* und *tt4* Mutante im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit NF nicht (Abbildung 3.82 A und B).

Abschließend kann festgehalten werden, dass die Verhinderung der Akkumulation einer Anthocyanvorstufe nach NF-Behandlung zur (partiellen) Umkehr der in den *gun4* und *gun5* beobachteten Entkopplung der Kernexpression führte.

### **3.12.7 Zusammenfassung zum retrograden Signal der *gun* Mutanten**

Die beobachtete Anthocyandefizienz der *gun* Mutanten konnte mit einer verminderten Expression von ABS-Genen in dieser Mutantengruppe korreliert werden. Die Isolation einer neuen *gun* Mutante (*tt4/CHS*) und die anschließenden Hemmungs- und Fütterungsexperimente der ABS unterstützen die Vermutung, dass die *PHANG* Expression in Anwesenheit von NF durch eine cytosolische Vorstufe des Flavonoidbiosyntheseweges beeinflusst wurde. Die reduzierte Akkumulation dieser Vorstufe führte zur Revertierung des in den *gun4* und *gun5* Mutanten beobachteten molekularen Phänotyp.



## 4 Diskussion

### 4.1 Phosphorylierung von GUN4

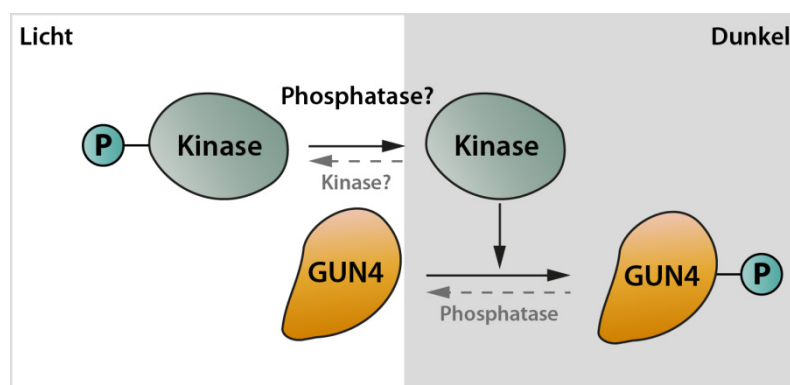
GUN4 stimuliert die Aktivität des MgCh-Komplexes, bindet Porphyrine, beeinflusst die ALA-Synthese und ist involviert in die retrograde Kommunikation zwischen Plastiden und Zellkern (Mochizuki et al., 2001; Larkin et al., 2003; Peter und Grimm, 2009). Vorhergehende Untersuchungen haben gezeigt, dass GUN4 für die korrekte Funktion der MgCh in photosynthetisch aktiven Organismen notwendig ist (Mochizuki et al., 2001; Larkin et al., 2003; Wilde et al., 2004; Sobotka et al., 2008; Peter und Grimm, 2009; Formighieri et al., 2012; Brzezowski et al., 2014). Trotzdem kann der bisherige Kenntnisstand nicht erklären, wie GUN4 auf post-translationaler Ebene reguliert wird, um die Aktivität der MgCh an sich ändernde Bedürfnisse für Chl anzupassen. Ungeklärt war zunächst, ob zum Beispiel der stimulatorische Einfluss von GUN4 in einer Dunkelphase fortbesteht. Mit anderen Worten war bisher nicht bekannt, ob GUN4 einen aktiven und inaktiven Zustand kennt. Daher sollte die vorliegende Arbeit prüfen, inwiefern die Phosphorylierung einen Einfluss auf den funktionellen Zustand von GUN4 hat und somit zum regulatorischen Netzwerk der TBS beiträgt.

#### 4.1.1 GUN4 wird verstärkt in der Dunkelheit durch eine membranständige Proteinkinase phosphoryliert

Mit einem eigens entwickelten *in vitro* Kinaseassay konnte gezeigt werden, dass rekombinantes GUN4 durch eine Kinaseaktivität aus einem *Arabidopsis* WT Extrakt phosphoryliert werden kann (Abbildung 3.2). Die Substitutionsmutanten GUN4(S264I) und GUN4(S264D) werden nicht phosphoryliert (Abbildung 3.2 B). Geht man davon aus, dass der Austausch der putativen Phosphorylierungsstelle in diesen Punktmutanten keinen Einfluss auf die Phosphorylierbarkeit einer weiteren möglichen Phosphorylierungsstelle hat, wurde somit die durch massenspektrometrische Analysen identifizierte Phosphorylierungsstelle von GUN4 bestätigt (Reiland et al., 2009). Ferner wurde der Beweis erbracht, dass GUN4 lediglich an der vorletzten Aminosäure, dem Serin an Position 264, phosphoryliert wird. Im Vergleich zu einer Stromafraktion isolierter Chloroplasten, wird GUN4 verstärkt durch eine Thylakoidpräparation phosphoryliert (Abbildung 3.2 D). Dies ist im Einklang mit der bevorzugten Lokalisation von GUN4 an der Thylakoidmembran (Abbildung 3.2 D). Auch die MgCh (Fuesler et al., 1984; Gibson et al., 1996; Larkin et al., 2003; Mochizuki et al., 2010) und andere Enzyme des Chl-Zweiges sind am Membransystem der Chloroplasten zu finden (Tanaka und Tanaka, 2007; Mochizuki et al., 2010). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die GUK-Aktivität mit dem endogenen GUN4-Gehalt eines *Arabidopsis*-Extraktes unter variierenden Lichtbedingungen korreliert (Abbildung 3.7). Im Vergleich zur Anzucht im Normal- und Hochlicht, waren GUN4-Gehalt und GUK-

Aktivität im Schwachlicht reduziert. Im Normal- und Hochlicht hingegen wird ein erhöhter GUN4-Gehalt von einer verstärkten GUN4-Phosphorylierung begleitet (Abbildung 3.7). Der bis zu einer Lichtintensität von circa  $120 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ansteigende GUN4-Gehalt wurden bereits zuvor beobachtet (Peter und Grimm, 2009) und ist im Einklang mit der lichtabhängigen Stimulation der MgCh (Papenbrock et al., 1999) durch GUN4. Die Voraussetzungen für eine schnelle Modifikation von GUN4 durch Phosphorylierung sind mit der sub-plastidären Co-lokalisierung und Co-expression der GUK mit ihrem Substrat erfüllt.

Interessanterweise konnte eine im Vergleich zur Lichtinkubation deutlich verstärkte Phosphorylierung von GUN4 in der Dunkelheit beobachtet werden (Abbildung 3.2). Offensichtlich wird die Phosphorylierbarkeit von GUN4 oder die GUK in Abhängigkeit des Lichtangebotes reguliert. Eine verstärkte Phosphorylierung könnte die Folge einer erhöhten GUK-Aktivität in der Dunkelheit sein. Die im Vergleich zur Dunkelheit reduzierte GUN4-Phosphorylierung im Licht würde demzufolge durch die Repression der GUK bedingt werden. Zusätzlich könnte der Phosphorylierungsgrad von GUN4 durch eine Phosphatase (PPase) modifiziert werden. Tatsächlich zeigte sich, dass der Phosphorylierungsgrad von in der Dunkelheit phosphoryliertem GUN4 während einer anschließenden Lichtinkubation abnahm (Abbildung 3.5). Dies war ein Indiz für die Existenz einer PPase im *Arabidopsis* Extrakt, die den Phosphatrest vom GUN4 wieder abspaltet. Daher wurde angenommen, dass nicht nur die GUK-Aktivität im Licht reduziert war, sondern auch die Aktivität einer PPase induziert wurde und folglich eine Antikorrelation zwischen beiden Aktivitäten vorlag (Abbildung 4.1).



**Abbildung 4.1: Modell zur Regulation der GUN4-Phosphorylierung im Licht oder Dunkelheit. Teil 1.**  
Weitere Erläuterungen im Text.

Ein Versuch die PPase-Aktivität durch Inhibitoren zu verringern, konnte diese Vermutung jedoch nicht bestätigen. Unter Einsatz zweier PPase-Hemmstoffmixturen nahm die GUN4-Phosphorylierung in einem *in vitro* Kinaseassay weder im Licht noch in der Dunkelheit zu (Abbildung 3.6). Entgegen den Erwartungen wurde sogar eine verminderte GUK-Aktivität im Licht und Dunkelheit in Anwesenheit

von PPase-Inhibitoren beobachtet. Unter der Annahme, dass lediglich Phosphataseaktivitäten durch die Hemmstoffe vermindert wurden, scheint somit die GUN4-Phosphorylierung positiv durch Phosphatasen beeinflusst zu werden. Es könnte daher angenommen werden, dass die GUK selbst durch Phosphorylierung reguliert wird. Im vorliegenden Fall würde sich die Phosphorylierung negativ, die Dephosphorylierung hingegen positiv auf die GUK-Aktivität auswirken (Abbildung 4.1). Wenngleich nicht ausschließlich spezifisch für Pflanzen, finden sich in der Literatur zahlreiche Beispiele für Proteinkinasen, deren Aktivität und Stabilität durch den Phosphorylierungszustand bestimmt wird (Baginsky et al., 1997; Xu et al., 1999; Zolnierowicz und Bollen, 2000; Adams, 2001; Willig et al., 2011; Trotta et al., 2016). Die wohl am besten charakterisierte plastidäre Kinase STN7 hat drei Phosphorylierungsstellen (1x Serin und 2x Threonin). Diese werden in Abhängigkeit von der angebotenen Lichtintensität- und -qualität in unterschiedlichem Maße phosphoryliert und tragen so zur Regulation der Stabilität und Aktivität der STN7 bei (Willig et al., 2011; Trotta et al., 2016). Ferner wurde für eine weitere Familie von Proteinkinasen (SRC-Kinasen) festgestellt, dass diese erst durch die Dephosphorylierung eines Tyrosinrestes und Phosphorylierung eines weiteren Tyrosins in die aktive Konformation überführt werden. Die Dephosphorylierung ist dabei ausschlaggebend für die Re-organisation der Kinase-Domänen und Herstellung der aktiven Konformation der SRC-Kinasen (Courtneidge, 1985; Xu et al., 1999). Demzufolge wäre es denkbar, dass auch die GUK durch eine Dephosphorylierung (in der Dunkelheit) aktiviert wird (Abbildung 4.1).

#### 4.1.2 Die Phosphorylierung von GUN4 wird durch Porphyrine modifiziert

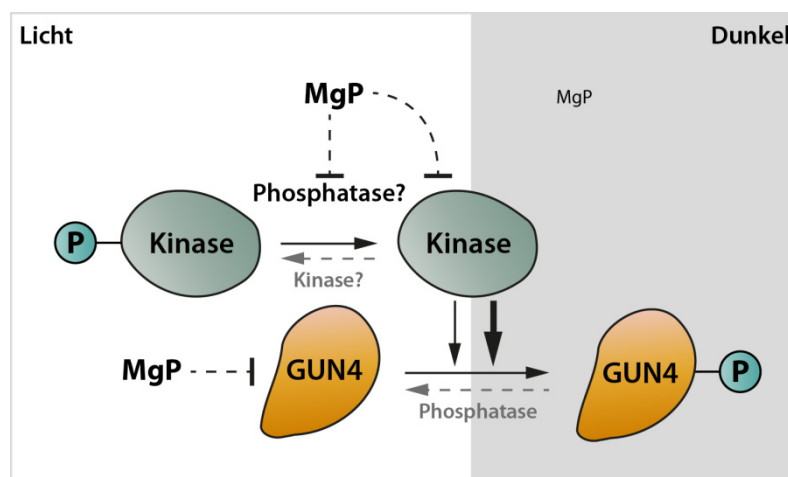
Wie im vorhergehenden Abschnitt erläutert, wird rekombinantes GUN4 verstärkt in der Dunkelheit phosphoryliert. Im Vergleich zur Lichtinkubation nimmt das Phosphorylierungssignal nach der Dunkelinkubation eines Kinaseassays um den Faktor 2-3 zu (Abbildung 3.2). Obwohl erste Indizien für die Art der Regulation der GUK abgeleitet werden konnten (Abbildung 4.1), blieb die Frage nach dem Stimulus/Signal zur Regulation der GUN4-Phosphorylierung bzw. der GUK-Aktivität zunächst ungeklärt. Einer der offensichtlichsten Faktoren, der sich durch ein variierendes Lichtangebot verändert, ist der Redox-Status der Chloroplasten (Buchanan und Balmer, 2005; Rochaix et al., 2012; Dietz und Hell, 2015). Bedingt durch die lichtabhängige Aktivität der Photosynthese stellt sich im Licht ein reduziertes und in der Dunkelheit ein vorrangig oxidiertes Redox-Milieu in den Chloroplasten ein. Nicht nur mobile Elektronen-Überträger der Photosynthese, sondern auch mobile Redox-Regulatoren, wie zum Beispiel TRX, werden durch Elektronen mit Ursprung in der Photosynthese im Licht reduziert. Diese reduzierten Redox-Regulatoren haben einen Einfluss auf die Aktivität redox-regulierter Prozesse im Chloroplasten. So wird zum Beispiel die Aktivität der STN7-Kinase im Rahmen des *state transition* über den Redox-Zustand des PQ-Pools reguliert (Bellafiore et al., 2005; Bonardi et al., 2005; Rochaix et al., 2012). Auch einzelne Enzymschritte der TBS unterliegen

einer Redox-Kontrolle (Stenbaek und Jensen, 2010; Richter und Grimm, 2013). Neben anderen, werden beispielsweise die MgP-Methyltransferase (Richter et al., 2013; Richter et al., 2016c), aber auch die I Untereinheit der MgCh (CHLI) durch Thiolreduktasen reguliert (Jensen et al., 2000; Ikegami et al., 2007; Luo et al., 2012; Perez-Ruiz et al., 2014). Daher wurde vermutet, dass sich ein vergleichbarer Mechanismus zur Kontrolle der GUK entwickelt hat. Entgegen der Hypothese kann für die GUK keine eindeutige Redox-Regulation abgeleitet werden. Weder im Licht noch in der Dunkelheit führt die Zugabe von oxidierenden Agenzien zu einer Veränderung der GUN4-Phosphorylierung im Vergleich zu Kontrollreaktionen (Abbildung 3.3). Die reduzierende Chemikalie DTT hingegen scheint einen positiven Einfluss auf die GUN4-Phosphorylierung auszuüben. Dieser vermeintlich positive Einfluss basiert jedoch auf der Veränderung des Laufverhaltens unterschiedlicher GUN4-Spezies in einem Proteingel (Abbildung 3.3, Vergleich der GUN4-Banden mit und ohne DTT). Auf diesen Befund wird in Abschnitt 4.3 (S.279) näher eingegangen. Die Anwendung von DTT ist nicht geeignet, die jeweils in der Kontrolle vorherrschende GUK-Aktivität im Licht oder in der Dunkelheit umzukehren (Abbildung 3.3). Angenommen, die GUK wird durch reduzierte Bedingungen im Licht inaktiviert, dann sollte die Zugabe von DTT den Lichtzustand in der Dunkelheit vortäuschen und folglich auch die GUK inaktivieren. Im Umkehrschluss sollte Wasserstoffperoxid durch das Nachahmen von oxidierten Bedingungen die GUK bzw. GUN4-Phosphorylierung im Licht stimulieren. Aufgrund der fehlenden Korrelation zwischen Redox-Zustand des Extraktes und GUN4-Phosphorylierung wurde eine thiolabhängige Kontrolle der GUK-Aktivität ausgeschlossen. Wenngleich die Kopplung der GUN4-Phosphorylierung an ein Lichtsignal einen attraktiven Mechanismus zur Regulation der lichtabhängigen TBS darstellen würde, scheint diese Art der Kontrolle für die GUK nicht vorzuliegen. Vielmehr deuten die durchgeführten Experimente auf eine Korrelation zwischen dem Gehalt von Porphyrinen und der GUN4-Phosphorylierung.

Im Licht hat die TBS ihren optimalen Aktivierungszustand. Im Vergleich zur Dunkelheit liegen im Licht deutlich erhöhte *steady state* Gehalte von MgP und MgPMME vor (Abbildung 3.26). In der Dunkelheit hingegen wird der Fluss von Intermediaten durch die FLU-Pchlide-vermittelte Repression der ALA-Synthese innerhalb weniger Minuten unterbunden (Meskauskiene et al., 2001; Meskauskiene und Apel, 2002; Lee et al., 2003; Richter et al., 2010; Kauss et al., 2012). Durch die Repression der GluTR-Aktivität in der Dunkelheit sinken die (Mg-)Porphyringehalte in kürzester Zeit unterhalb des Detektionslimits. Bedingt durch die obligat lichtabhängige Aktivität der POR in Angiospermen kann in der Dunkelheit lediglich Pchlide detektiert werden (Abbildung 3.26). In einer folgenden Lichtphase wird Pchlide zu Chlide umgewandelt, die Dunkelrepression der ALA-Synthese wird aufgehoben und die Gehalte von (Mg-) Porphyrinen steigen innerhalb von ein bis zwei Stunden auf den während eines Tages messbaren Maximalwert (Abbildung 3.26 und Papenbrock et al. (1999)). Interessanterweise führt die Anwesenheit von exogenem MgP, nicht jedoch von ProtoIX



oder Häm, in einem *in vitro* Kinaseassay zu einer Repression der GUN4-Phosphorylierung (Abbildung 3.4 A und C). Auch die durch Fütterung von ALA induzierte Erhöhung der endogenen (Mg-)Porphyrin-Gehalte in *Arabidopsis* Pflanzen (Abbildung 3.29) übt einen negativen Einfluss auf die Stärke der Phosphorylierung von GUN4 aus (Abbildung 3.4 B). Somit existiert eine Korrelation zwischen GUN4-Phosphorylierung und Porphyringehalten. Diese Korrelation wurde auch in *gun4* und *gun5* (MgCh H Untereinheit) Mutanten beobachtet. Beide Mutantenlinien sind durch verringerte *steady state* Gehalte des Produktes der MgCh (MgP) charakterisiert und zeigen eine 2-3fache Stimulation der Phosphorylierung von rekombinantem GUN4 (Abbildung 3.9). Aus dem Vergleich mit anderen Mutanten mit reduzierten Chlorophyllgehalten und WT-artiger GUN4-Phosphorylierung (Abbildung 3.8), lässt sich ableiten, dass die verstärkte Phosphorylierung von GUN4 spezifisch für die *gun4* und *gun5* Mutanten ist. Neben der Möglichkeit, dass die Expression der GUK verändert sein könnte, deutet dieser Befund auf einen Zusammenhang zwischen verringerten MgP-Gehalten und der Stimulation der GUN4-Phosphorylierung in *gun4* und *gun5* Mutanten hin.



**Abbildung 4.2: Modell zur Regulation der GUN4-Phosphorylierung im Licht oder Dunkelheit. Teil 2.**

MgP hat einen negativen Einfluss auf die GUN4-Phosphorylierung. Möglicherweise wird die GUK-Aktivität indirekt über eine MgP-regulierte Phosphatase oder direkt durch MgP reguliert. Alternativ könnte die Bindung von MgP an GUN4 die Phosphorylierbarkeit des Proteins im Licht beeinflussen.

Mit den oben aufgeführten experimentellen Hinweisen lässt sich das Modell zur Regulation der GUN4-Phosphorylierung erweitern (Abbildung 4.2). Erhöhte MgP-Gehalte, wie sie in einer im Licht gehaltenen Pflanze detektiert werden können, reprimieren die GUN4-Phosphorylierung. Im Gegensatz dazu wurde eine Zunahme der Phosphorylierung von GUN4 unter reduzierten MgP-Gehalten beobachtet (Dunkelheit). Denkbar wäre, dass die GUK selbst oder eine GUK-regulierende PPase durch MgP reguliert werden. Da GUN4 das MgP binden kann (Abbildung 3.23 und Larkin et al. (2003)), könnte auch diese Bindung selbst die Phosphorylierung von GUN4 beeinflussen (Abbildung 4.2). Es könnte spekuliert werden, dass die Interaktion mit der GUK oder die Zugänglichkeit der im C-Terminus befindlichen Phosphorylierungsstelle des GUN4 der Angiospermen (siehe Abschnitt 3.9,

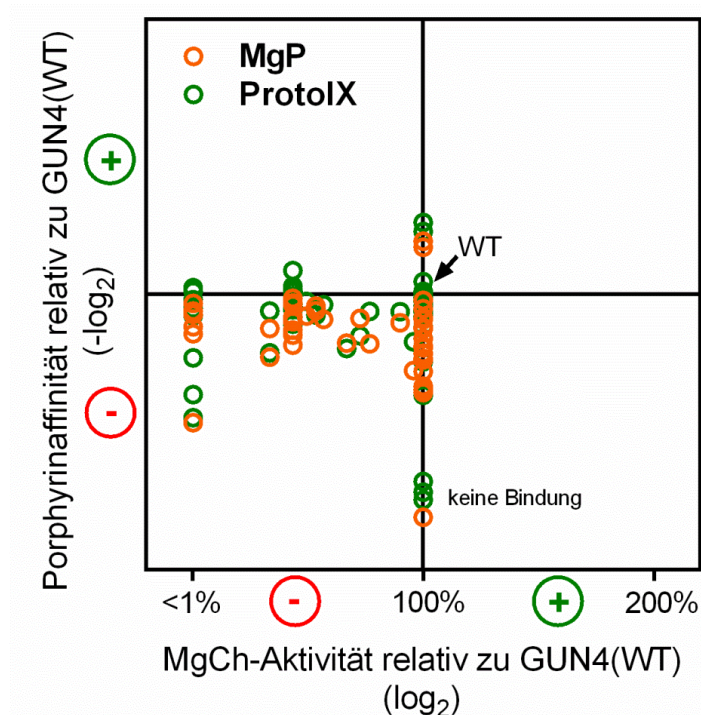
S.179) durch die Bindung von TBS-Intermediaten beeinflusst wird. Dem steht jedoch gegenüber, dass die Bindung von MgP an GUN4 keine drastische strukturelle Re-organisation des Proteins zur Folge hat (Chen et al., 2015c; Kopečna et al., 2015). Da die bisher veröffentlichten Strukturmodelle mit den cyanobakteriellen und GUN4-Homologen aus Grünalgen erzeugt wurden, die den flexiblen C-Terminus nicht besitzen, kann zum Verhalten des C-Terminus nach Porphyrinbindung an GUN4-Homologe aus Angiospermen keine Aussage getroffen werden. Den bisher veröffentlichten Daten folgend, stehen der C-Terminus von und die Porphyrinbindung an GUN4 jedoch in keinem funktionellen Zusammenhang. Ein C-terminal verkürztes GUN4 aus Reis zeigt dieselbe Bindung von Porphyrinen wie das korrespondierende WT-Protein (Zhou et al., 2012). Auch das cyanobakterielle GUN4, mit im Vergleich zu den Angiospermen deutlich kürzerem C-Terminus (Abbildung 3.38), bindet ProtoIX und MgP mit einer zum *Arabidopsis* GUN4 vergleichbaren Affinität (Abbildung 3.42 und Larkin et al. (2003); Davison et al. (2005); Verdecia et al. (2005); Adhikari et al. (2009)). Unter Einsatz von Punktmutanten von GUN4, die eine veränderte Bindungsaffinität von Porphyrinen zeigen (Davison et al., 2005; Verdecia et al., 2005; Kopečna et al., 2015), könnte untersucht werden, ob und inwiefern die Bindung von Porphyrinen an GUN4 einen Einfluss auf dessen Phosphorylierung innerhalb eines Kinaseassays hat.

In der Zusammenfassung lässt sich aus den unterschiedlichen Kinaseaktivitäten in Pflanzenextrakten als indirektes Maß für den Gehalt an phosphoryliertem GUN4 folgendes ableiten: Pflanzen akkumulieren im Licht weniger und in der Dunkelheit mehr phosphoryliertes GUN4. Diese Schlussfolgerung sollte mit dem spezifischen Nachweis von phosphoryliertem GUN4 in Extrakten von im Licht oder in der Dunkelheit gehaltenen Pflanzen bestätigt werden. Obwohl sich der phosphorylierungsspezifische pGUN4-Antikörper als exzellentes Werkzeug zur Untersuchung der GUN4-Phosphorylierung im Rahmen von *in vitro* Analysen bewährt hat, ist es bisher nicht gelungen den Phosphorylierungsstatus von GUN4 in einem Pflanzenextrakt eingehender zu analysieren (siehe Abschnitt 3.8, S.173). In zukünftigen Experimenten könnte einerseits der quantitative Nachweis von phosphoryliertem GUN4 mittels Analyse des Phosphoproteoms von Chloroplasten erfolgen. Andererseits sollte die Verbesserung der Anreicherungstechniken von GUN4 aus einem Pflanzenextrakt und der anschließende Nachweis von phosphoryliertem GUN4 mit dem pGUN4-Antikörper vorangetrieben werden.

### 4.1.3 Porphyrinbindung, sub-plastidäre Lokalisation und Stabilität werden nicht durch die Phosphorylierung von GUN4 beeinflusst

#### Porphyrimbindung

Eine Besonderheit des nicht-enzymatisch aktiven GUN4-Proteins ist die Bindung von Intermediaten der TBS. Wenngleich GUN4 eine Vielzahl von unterschiedlichen (Mg-)Porphyrinen binden kann (Adhikari et al., 2009), bindet es bevorzugt das Substrat (ProtoIX) und Produkt (MgP) der MgCh. Im Vergleich zu ProtoIX ist die Affinität gegenüber MgP sogar 10fach höher (Larkin et al., 2003; Davison et al., 2005; Verdecia et al., 2005; Adhikari et al., 2009). Es wird spekuliert, dass die Bindung der Porphyrine an GUN4 die MgCh-Reaktion begünstigt. Zum einen könnte GUN4 als Substrat-Bindeprotein die Bereitstellung von ProtoIX für die MgCh unterstützen. Zum anderen wurde vermutet, dass GUN4 das Produkt (MgP) der MgCh-Reaktion aufnimmt und an das folgende Enzym übergibt. In Anwesenheit von GUN4 würde das Reaktionsgleichgewicht in Richtung des Produktes verschoben und die Bildung von MgP durch die MgCh beschleunigt werden (Larkin et al., 2003; Davison et al., 2005; Verdecia et al., 2005; Adhikari et al., 2009; Chen et al., 2015c; Kopečna et al., 2015; Tarahi Tabrizi et al., 2015). Diesen Hypothesen steht jedoch gegenüber, dass es keinen Zusammenhang zwischen der Porphyrinbindung an und Stimulation der MgCh durch GUN4 zu geben scheint (Davison et al., 2005; Verdecia et al., 2005). Die quantitative Gegenüberstellung von Porphyrinbindung und Stimulation der MgCh durch Punktmutanten von cyanobakteriellem GUN4 mit veränderter Affinität gegenüber Porphyrinen bestätigt dies (Abbildung 4.3). So existieren Punktmutanten von GUN4, die durch den vollständigen Verlust einer Porphyrinbindung charakterisiert sind, aber gleichzeitig eine WT-gleiche Stimulation der *in vitro* MgCh-Reaktion bewirken. Auch eine Erhöhung der Affinität gegenüber MgP oder ProtoIX korreliert nicht mit einer erhöhten Stimulation der MgCh-Aktivität (Abbildung 4.3). Ferner steht die Stimulationsfähigkeit der MgCh nicht im Zusammenhang mit der Bindung von Porphyrinen. Punktmutanten mit einem Verlust der MgCh-Stimulation können dennoch Porphyrine binden.



**Abbildung 4.3: Zusammenhang zwischen Porphyrinbindung an und Stimulation der MgCh durch GUN4.**

Die hier gezeigten Daten wurden aus veröffentlichten Datensätzen extrahiert und normalisiert (Davison et al., 2005; Verdecia et al., 2005; Kopečna et al., 2015). Jeder Datenpunkt entspricht dabei der Affinität gegenüber ProtoIX (grün) oder MgP (orange) aufgetragen gegen die jeweilige Stimulationsfähigkeit der *in vitro* MgCh-Reaktion durch das WT GUN4 oder GUN4 Punktmutanten von Cyanobakterien. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die jeweiligen Mutationen nicht vermerkt.

Zusätzlich zum Einfluss auf die MgCh-Reaktion selbst, könnte GUN4 auch als „Puffer“ für überschüssige, freie und phototoxisch wirksame Porphyrine dienen (Peter und Grimm, 2009). Die Bindung der makrozyklischen TBS-Intermediate an GUN4 könnte diese von der Kollision mit molekularem Sauerstoff abschirmen und so die Produktion von ROS minimieren. Gegen diese Funktion spricht, dass die Porphyrine nur teilweise von strukturellen Elementen des GUN4 umschlossen werden (Chen et al., 2015c). Die Bindung von ProtoIX an GUN4 soll sogar einen ROS-fördernden Effekt haben (Tarahi Tabrizi et al., 2016).

Obwohl die physiologische Signifikanz der Porphyrinbindung bisher nicht eindeutig aufgeklärt ist, wurde der Einfluss der Phosphorylierung auf die Bindung von Porphyrinen an GUN4 im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Für diese Fragestellung wurden rekombinante *Arabidopsis* GUN4(WT) und zwei Punktmutanten (S264I und S264D) erzeugt. Während GUN4(S264I) den *knockout* der Phosphorylierungsstelle bewirkt (Abbildung 3.2), simuliert der Austausch des Serins zu Aspartat im GUN4(S264D) eine dauerhafte Phosphorylierung (Maciejewski et al., 1995; Oreb et al., 2007; Willig et al., 2011). Die mit diesen Proteinen durchgeführten Porphyrin-Bindungsstudien lassen den Schluss zu, dass die Anwesenheit einer negativ geladenen Aminosäure (Aspartat) im C-Terminus, welche dem Phospho-Serin in Ladung und Größe ähnelt, weder einen positiven noch negativen Einfluss auf die

Bindung von ProtoIX und MgP hat (Abbildung 3.23). Die im Vergleich zum GUN4(WT) unveränderten Porphyrin-Bindungseigenschaften von GUN4(S264D) sind zugleich ein Beleg für die strukturelle Integrität des punktmutierten Proteins. Die WT-gleiche Faltung des GUN4(S264D) konnte durch Schmelzpunktanalysen bestätigt werden (Abbildung 3.22). Somit bestimmt die Phosphorylierung des C-Terminus die Porphyrin-Bindungseigenschaften des GUN4 nicht. Dies ist im Einklang mit dem zuvor beschriebenen Befund, dass der C-Terminus nicht, und folglich auch nicht der Phosphorylierungszustand, über die Bindung von Porphyrinen an GUN4 bestimmt (Verdecia et al., 2005; Davison und Hunter, 2011; Zhou et al., 2012; Chen et al., 2015c; Kopečna et al., 2015).

### Sub-plastidäre Lokalisation

Neben den diskutierten Funktionen der Porphyrinbindung an GUN4, existieren belastbare Beweise dafür, dass die Bindung von Porphyrinen die sub-plastidäre Lokalisation von GUN4 beeinflussen kann. Im Zuge der lichtinduzierten Aktivierung der TBS und dem damit verbundenen Anstieg von Intermediatgehalten, ist die Bindung von Porphyrinen für die Rekrutierung von GUN4 an die Thylakoidmembran und die Interaktion mit der MgCh notwendig (Adhikari et al., 2009; Adhikari et al., 2011). Im Rahmen der lichtabhängigen Aktivierung der TBS wird die MgCh somit stimuliert und der Fluss von Intermediaten in den Chl-Zweig begünstigt (Czarnecki und Grimm, 2012). In Übereinstimmung mit der unveränderten Porphyrinbindung, ist auch die sub-plastidäre Lokalisation unabhängig vom Phosphorylierungszustand des GUN4. Sowohl in phosphorylierter, als auch nicht-phosphorylierter Form kann GUN4 an die Thylakoidmembran binden (Abbildung 3.3).

### Stabilität von GUN4

Zusätzlich zum Einfluss auf die Lokalisation, gibt es Hinweise für einen Zusammenhang zwischen der Bindung von Porphyrinen und der Stabilität des GUN4-Proteins. Die *gun4-1* Mutante kodiert für ein punktmutiertes GUN4 in dem das Leucin an Position 88 zu Phenylalanin ausgetauscht ist. Im Vergleich zum WT akkumuliert die *gun4-1* Mutante nur einen Bruchteil des GUN4-Gehaltes und ist folglich eine durch die Punktmutation bedingte *knockdown* Mutante (Larkin et al., 2003). Spätere Analysen an den GUN4(L88F)-Homologen aus Cyanobakterien zeigten, dass der entsprechende Aminosäureaustausch zu einer 10-15fachen Erhöhung der Affinität gegenüber MgP und ProtoIX führte, ohne jedoch die strukturelle Integrität des punktmutierten Proteins zu beeinflussen (Davison et al., 2005). Vereint man beide Befunde, scheint es eine (negative) Korrelation zwischen Porphyrinbindung und der Stabilität von GUN4 zu geben. Unterstützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass das GUN4-Homolog in einer ProtoIX-akkumulierenden *chld-1* Mutante von *Chlamydomonas* (D Untereinheit der MgCh) de-stabilisiert wird (Brzezowski et al., 2014). Dies würde für eine Funktion von GUN4 im Porphyrinabbau und -detoxifizierung, wie sie von Peter und Grimm (2009) vorgeschlagen wurde, sprechen.

Die Proteinphosphorylierung ist ein Mechanismus zur Kontrolle der Stabilität eines Proteines (Adams, 2001; Willig et al., 2011; Trotta et al., 2016; Zhao et al., 2016). Daher sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen Porphyrinakkumulation, Stabilität und Phosphorylierung von GUN4 untersucht werden. Im Gegensatz zu der in *Chlamydomonas* beobachteten ProtoIX-abhängigen Destabilisierung des GUN4, konnte diese Beobachtung für das *Arabidopsis* GUN4 nicht gemacht werden. Weder die endogene Erhöhung der *steady state* Gehalte von Porphyrinen durch ALA-Fütterung (Abbildung 3.29), noch durch die genetische Beeinflussung der Cyclase-Reaktion, die eine Akkumulation von MgP und MgPMME bewirkt (*CHL27* RNAi-Linien, Abbildung 3.30), führten zu einem Abbau von GUN4 in *Arabidopsis*-Pflanzen. Folglich gibt es keine Hinweise auf eine porphyrinvermittelte Quantitätskontrolle von GUN4 in *Arabidopsis*. Auch wird die Destabilisierung von GUN4 in der *gun4-1* Mutante nicht durch die Phosphorylierung begünstigt oder gar eingeleitet. Im Vergleich zur *gun4-1* Mutante und *GUN4* *knockout* Mutanten, die mit dem *GUN4*(L88F) komplementiert wurden (*gun4-2/GUN4-F*), wird ein nicht-phosphorylierbares *GUN4-1* (*GUN4*(L88F+S264I)) nicht stabilisiert (Abschnitt 3.7.3, S.168 und Abbildung 3.33). Die *gun4-2/GUN4-F+I* Linien sind weder phänotypisch, noch auf der Ebene molekularer Aspekte der TBS von *gun4-1* oder *gun4-2/GUN4-F* Linien zu unterscheiden (Abschnitt 3.7.3, S.168). Zusätzlich kann festgehalten werden, dass keine Korrelation zwischen GUK-Aktivität und dem GUN4-Gehalt in *gun4-1*, *gun4-3* und *gun5* Mutanten besteht. Obwohl alle drei Genotypen eine erhöhte GUK-Aktivität zeigen, ist der GUN4-Gehalt in der *gun5* im Vergleich zu den *gun4* Mutanten und dem WT sogar noch erhöht (Abbildung 3.9). Eine anzunehmende verstärkte Phosphorylierung von GUN4 in den *gun5* Mutanten destabilisiert das GUN4 nicht. Ferner folgt der GUN4-Gehalt der Expression des entsprechenden Transgenes in den *gun4-2/GUN4-I* (*knockout* Phosphorylierungsstelle) und *gun4-2/GUN4-D* (Phosphomimick) Linien (Abschnitt 3.2, S.133 und Abschnitt 3.3, S.139).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Phosphorylierung von GUN4 keinen Einfluss auf die Porphyrinbindung und die sub-plastidäre Lokalisation *in vitro* hat. Zusätzlich zeigte sich, dass die Phosphorylierung keine Determinante für die *in vivo* Stabilität von GUN4 ist.

#### **4.1.4 Phosphorylierung von GUN4 reduziert die Stimulationseffizienz der MgCh**

Trotzdem wesentliche Merkmale des GUN4s durch den Austausch der Phosphorylierungsstelle unverändert blieben, führte die Expression des *GUN4*(S264D) in *gun4-2 knockout* Mutanten (*gun4-2/GUN4-D*) zu einer Beeinträchtigung der TBS (Abschnitt 3.3, S.139). In den *gun4-2/GUN4-D* Linien wurde eine Reduktion der ALA-Synthesekapazität (Abbildung 3.25), sowie verminderte *steady state* Gehalte von Mg-Porphyrinen und Chl beobachtet (Abbildung 3.14). Da die erfassten Veränderungen in diesen Mutanten nicht durch die (post-)transkriptionelle Reduktion essentieller TBS-Proteine erklärt werden konnten (Abbildung 3.15 und Abbildung 3.16), musste von einer post-translationalen

Veränderung der TBS-Reaktionen in den *gun4-2/GUN4-D* Linien ausgegangen werden. Die unter verschiedenen Anzuchtsbedingungen gemessenen Parameter in den *GUN4-D* Linien ähnelten dabei den Ergebnissen, wie sie für *Arabidopsis gun4* und *gun5* Mutanten bestimmt wurden. Auch zeigt sich eine Ähnlichkeit zu Tabak CHLH, bzw. CHLI-Antisense-Linien (Abbildung 3.9, Abbildung 3.17, Abbildung 3.18 und Papenbrock et al. (2000a); Papenbrock et al. (2000b); Mochizuki et al. (2001); Larkin et al. (2003); Peter und Grimm (2009)).

Im Vergleich zu den *gun4-1* und *gun4-3* Mutanten können sich die *gun4-2/GUN4-D* Linien besser an Hochlicht-Bedingungen anpassen (Abbildung 3.17). Die Verstärkung der Effekte in den *GUN4*-defizienten Mutanten unter höheren Lichtintensitäten, sind ein Beleg für eine lichtintensitäts-abhängige Stimulation der MgCh-Reaktion. Daher steigt der *GUN4/GUN4*-Gehalt mit steigender Lichtintensität im WT (Abbildung 3.7 und Peter und Grimm (2009)). Das zur Erzeugung der *gun4-2/GUN4-D* Mutanten verwendete Konstrukt enthält die vollständige genomische Sequenz von *GUN4* inklusive der regulatorischen Elemente des Promotors. Folglich, und im Gegensatz zu den *gun4* Mutanten, kann daher der *GUN4*-Gehalt in den *gun4-2/GUN4-D* Linien an einen erhöhten Bedarf unter gesteigerten Lichtintensitäten angepasst werden (Abbildung 3.34). Dennoch zeigten die *GUN4-D* Linien im Hochlicht einen chlorotischen Phänotyp, sodass nur eine partielle Komplementation der *gun4-2 knockout* Mutante mit dem Phosphomimikry *GUN4* erzielt werden konnte.

Bedingt durch die Ähnlichkeit zu den *gun4* und *gun5* Mutanten und im Zusammenhang mit den bereits veröffentlichten Ergebnissen zu *GUN4*, konnten die beobachteten Effekte in den *gun4-2/GUN4-D* mit einer veränderten MgCh-Aktivität in Verbindung gebracht werden. Wie sich herausstellte, führt das Vortäuschen der Phosphorylierung von *GUN4* zu einer deutlich verringerten MgCh-Aktivität in Extrakten von *gun4-2/GUN4-D* Linien im Vergleich zum WT (Abbildung 3.19). An dieser Stelle ist es wichtig zu betonen, dass die *gun4-2/GUN4-D* Linien trotz mindestens WT-artiger *GUN4*-Gehalte (Abbildung 3.16) eine post-translational reduzierte MgCh-Aktivität aufweisen. Auch die *in vitro* MgCh-Aktivität kann durch das *GUN4(S264D)*-Protein nur im reduzierten Maße im Vergleich zur Reaktion mit dem *GUN4(WT)* stimuliert werden (Abbildung 3.21). Wie zuvor diskutiert, ist die reduzierte Stimulationsfähigkeit der MgCh keine Folge einer veränderten Bindung von Porphyrinen, strukturellen Integrität oder Stabilität des *GUN4(S264D)*-Protein (siehe Abschnitt 4.1.3, S.263).

Die MgCh interagiert mit dem im Chl-Zweig nachfolgenden Enzym, der MgP-Methyltransferase (MgPMT). Der *knockdown* der MgCh I Untereinheit (*CHLI*) reduziert die MgPMT-Aktivität und der *knockdown* von *CHLM* (MgPMT) reduziert die MgCh-Aktivität. Gleichzeitig stimuliert CHLH die *in vitro* und *in vivo* Aktivität der MgPMT (Hinchigeri et al., 1997; Jensen et al., 1999b; Papenbrock et al., 2000b; Alawady et al., 2005; Alawady und Grimm, 2005; Richter et al., 2013). Aufgrund der

metabolischen Kopplung beider Enzyme musste daher ausgeschlossen werden, dass die Phosphorylierung von GUN4 einen negativen Einfluss auf die MgPMT hatte und die reduzierte MgCh-Aktivität demnach keine Konsequenz einer reduzierten MgPMT-Aktivität in den *gun4-2/GUN4-D* Linien war. Unabhängig vom Phosphorylierungszustand übt GUN4 weder auf die *in vitro* (Abbildung 3.21) noch *in vivo* (Abbildung 3.19) Aktivität der MgPMT einen positiven oder negativen Einfluss aus. Folglich kann die beobachtete Reduktion der MgCh-Aktivität in Anwesenheit von phosphoryliertem GUN4 nur eine spezifische Folge der veränderten Funktionsweise von GUN4 sein. Auch die reduzierte ALA-Synthese in den *gun4-2/GUN4-D* Linien (Abbildung 3.25) ist als Folge der verminderten MgCh-Aktivität anzusehen. Diese Art der *feedback* Regulation der ALA-Synthese wurde ebenfalls in *gun4* und MgCh Mutanten beobachtet (Papenbrock et al., 2000a; Papenbrock et al., 2000b; Mochizuki et al., 2001; Larkin et al., 2003; Peter und Grimm, 2009). In diesen Mutanten soll die Reduktion der ALA-Synthese der Vermeidung der Akkumulation von ProtoIX, beim Vorliegen einer reduzierten MgCh-Aktivität, dienen. Die molekularen Hintergründe dieser *feedback* Regulation sind bisher nicht aufgeklärt. Es zeigt sich jedoch, dass GUN4 und seine Phosphorylierung nur über die Regulation der MgCh-Aktivität indirekt an der Kontrolle der ALA-synthetisierenden Enzyme beteiligt ist.

Interessanterweise wirkt sich der *knockout* der Phosphorylierungsstelle in GUN4(S264I) weder *in vitro* (Abbildung 3.19) noch *in vivo* (Abbildung 3.21) auf die Stimulationseffizienz der MgCh aus. Die Expression von GUN4(S264I) im *gun4-2* Hintergrund führt zur vollständigen Komplementation des weißen *GUN4 knockout* Phänotyps (Abbildung 3.10). Hieraus kann geschlossen werden, dass die Phosphorylierung nicht zur Aktivierung des GUN4 notwendig ist und die optimale Stimulation der MgCh durch de-phosphoryliertes GUN4 erzielt wird (Abbildung 3.26). In der Literatur findet sich ein analoges Beispiel. Eine nicht-phosphorylierbare STN7-Kinase (Mutation Phosphorylierungsstellen) verhält sich wie das WT-Protein (Willig et al., 2011). Es wird deutlich, dass der *knockout* der Phosphorylierungsstelle nicht unbedingt zu negativen Effekten führen muss. Dies scheint insbesondere dann der Fall zu sein, wenn die Phosphorylierung einen negativen Einfluss auf die Funktion eines Proteins hat.

Neben dem Einfluss auf die Aktivität kann die Phosphorylierung eines Proteins eine Veränderung in der Interaktion mit anderen Proteinen bewirken (Kim et al., 2004; Bellafiore et al., 2005). Die Interaktion von GUN4 mit der H Untereinheit der MgCh (Larkin et al., 2003) vermittelt die Stimulation der MgCh-Aktivität in photosynthetisch aktiven Organismen durch einen bisher unbekannten Mechanismus (Mochizuki et al., 2001; Larkin et al., 2003; Wilde et al., 2004; Sobotka et al., 2008; Peter und Grimm, 2009; Formighieri et al., 2012; Brzezowski et al., 2014; Kopečna et al., 2015). Wird GUN4 phosphoryliert, wird die Fähigkeit zur Stimulation der MgCh eingeschränkt (diese Arbeit). Daher wurde spekuliert, dass die Anwesenheit einer negativ geladenen Phosphatgruppe im



flexiblen C-Terminus von GUN4 aus Angiospermen (Abschnitt 3.9, S.179) zur Störung der Interaktion mit der H Untereinheit der MgCh führt. Unterstützt wurde diese Vermutung durch die Identifizierung einer Protein-Protein-Interaktionsfläche innerhalb der letzten drei Aminosäuren des *Arabidopsis* GUN4 (Abbildung 3.47). Die Abwesenheit dieser möglichen Interaktionsfläche in C-terminal verkürzten GUN4-Proteinen hat eine reduzierte Stimulation der *in vitro* MgCh-Aktivität zur Folge (Abbildung 3.46 und Zhou et al. (2012)). Ferner sind die GUN4-Homologe aus Cyanobakterien und Grünalgen, welche einen verkürzten C-Terminus aufweisen, nicht in der Lage den MgCh-Komplex aus Angiospermen zu stimulieren (Abbildung 3.41). Umfangreiche Protein-Protein-Interaktionsstudien zwischen der H Untereinheit der MgCh und GUN4-Proteinen konnten diese Hypothese jedoch nicht bestätigen. Beide, GUN4(WT) und GUN4(S264D), haben dieselbe Kapazität die H Untereinheit zu binden (Abbildung 3.24). Demzufolge ist nicht davon auszugehen, dass die Interaktion mit der H Untereinheit durch die Phosphorylierung des GUN4 C-Terminus beeinträchtigt wird. Tatsächlich sind die Mechanismen zum Aufbau und die Funktion der MgCh hochgradig komplex und basieren nicht nur auf der bilateralen Interaktion von GUN4 mit der H Untereinheit der MgCh (siehe Abschnitt 1.5, S.33). Trotz publizierter Strukturdaten von GUN4 (Chen et al., 2015c), MgCh H (Qian et al., 2012; Adams et al., 2014; Chen et al., 2015a) und I/D Untereinheiten (Lundqvist et al., 2010) ist es bisher nicht gelungen die dynamische Assemblierung der MgCh und die molekularen Vorgänge der Stimulation durch GUN4 auf struktureller Ebene nachzuvollziehen. In der Theorie könnten daher eine Vielzahl von Vorgängen während der MgCh-Reaktion durch GUN4 und seine Phosphorylierung beeinflusst werden. Obwohl GUN4 nicht essentiell für die *in vitro* Aktivität der MgCh ist (Gibson et al., 1995; Jensen et al., 1996b; Petersen et al., 1998; Gibson et al., 1999; Jensen et al., 1999a), könnte (phosphoryliertes) GUN4 einen allgemeinen Einfluss auf die Stabilität des MgCh-Komplexes haben. Auch die Bildung und Rekrutierung des I-D-Oligomers, oder die Bindung von ProtoIX an die H Untereinheit könnte durch GUN4 beeinflusst werden. Um diese Vermutungen eingehender zu studieren, sollte in einem ersten Ansatz geprüft werden, ob und in welchem Zustand GUN4 die Assemblierung der MgCh begünstigen oder verhindern kann. Dabei können die folgenden Fragen und die aus ihnen abgeleiteten Experimente zur Aufklärung der molekularen Vorgänge während der MgCh-Reaktion beitragen: Existiert ein Zusammenhang zwischen der für die MgCh-Reaktion notwendigen ATPase-Aktivität des I-D-Oligomers und GUN4(-Phosphorylierung)? Begünstigt (dephosphoryliertes) GUN4 die Übertragung der durch die ATP-Hydrolyse gewonnenen Energie auf die H Untereinheit der MgCh? Wird die Bindung des I-D-Oligomers an die H Untereinheit durch GUN4 beeinflusst? In Ergänzung zu *pulldown* Experimenten mit rekombinanten Proteinen (Davison und Hunter, 2011) oder der Messung von ATPase-Aktivitäten (Adams et al., 2016), kann die Weiterführung der quantitativen Analyse von Bindungsparametern mittels Thermophorese wichtige

Erkenntnisse zum Verständnis der dynamischen Vorgänge zwischen den einzelnen Untereinheiten der MgCh und GUN4 beisteuern.

#### **4.1.5 Regulation der MgCh durch die Phosphorylierung des GUN4 C-Terminus ist beschränkt auf die Angiospermen: ein Arbeitsmodell**

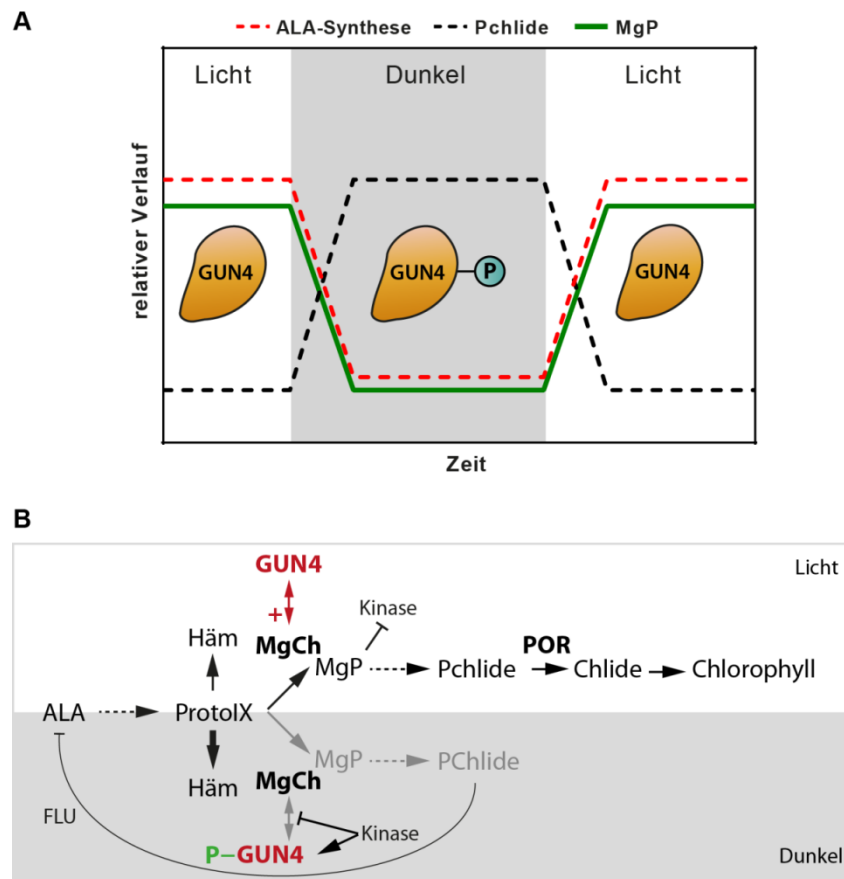
Nachdem der Einfluss der GUN4-Phosphorylierung auf die TBS im Allgemeinen und die MgCh-Reaktion im Speziellen diskutiert wurde, soll die Phosphorylierung von GUN4 im folgenden Abschnitt in einen evolutionären und regulatorischen Kontext gesetzt werden.

Bioinformatische Analysen ergaben, dass die Herausbildung der Phosphorylierungsstelle, wie sie im *Arabidopsis* GUN4 identifiziert wurde, von einer Verlängerung des GUN4 C-Terminus während der Evolution von photosynthetisch aktiven Organismen begleitet wurde (Abbildung 3.38 und Abbildung 3.39). Zusätzlich konnten biochemische Analysen belegen, dass die Möglichkeit zur Phosphorylierung von GUN4 auf die Gruppe der Angiospermen beschränkt ist (Abbildung 3.40). Interessanterweise bestimmt die Länge des C-Terminus von GUN4 ebenfalls über die Stimulationsfähigkeit der MgCh (Abbildung 3.46 und Abbildung 3.41). Funktionell aktive GUN4-Homologe aus Cyanobakterien und Grünalgen (Abbildung 3.42), die einen kürzeren C-Terminus als das *Arabidopsis* GUN4 aufweisen (Abbildung 3.38 und Abbildung 3.43), sind nicht in der Lage die MgCh aus Reis zu stimulieren (Abbildung 3.41). Erst die Verknüpfung des *Arabidopsis* GUN4 C-Terminus mit der Kerndomäne des *Chlamydomonas* GUN4 führt zu einer partiellen Stimulation der *in vitro* Aktivität der MgCh aus Reis (Abbildung 3.44). Auf den ersten Blick war dieses Ergebnis unerwartet, können doch die GUN4-Homologe von Cyanobakterien und Grünalgen ihre spezieiseigene MgCh *in vitro* und *in vivo* stimulieren (Larkin et al., 2003; Wilde et al., 2004; Sobotka et al., 2008; Peter und Grimm, 2009; Formighieri et al., 2012; Brzezowski et al., 2014). Auf den zweiten Blick ist diese Beobachtung hingegen ein Beweis dafür, dass sich im Zuge der unabhängigen Evolution von beispielsweise Cyanobakterien und Angiospermen speziesspezifische Determinanten für die Stimulation der MgCh durch GUN4 entwickelt haben. Eine davon ist offensichtlich die Länge des GUN4 C-Terminus. Aus diesen Befunden lässt sich demzufolge ableiten, dass die Co-Evolution des C-Terminus mit der Phosphorylierungsstelle des GUN4 zur Voraussetzung der Regulation der MgCh in Angiospermen wurde. Mit anderen Worten gesagt, wird die MgCh-Aktivität in den im evolutionären Sinne älteren Organismen nicht durch die spezifische Phosphorylierung am GUN4 C-Terminus reguliert.

Warum wird die MgCh-Aktivität in Angiospermen, nicht aber in Gymnospermen, Grünalgen und Cyanobakterien über die Phosphorylierung von GUN4 reguliert? Der wohl wichtigste Grund für diesen Umstand ist die unterschiedliche Aktivität und Regulation der TBS in diesen Organismen. Anders als in Angiospermen ist die Aktivität der ALA-synthetisierenden Enzyme in Grünalgen und

Cyanobakterien nicht an die Aktivität der MgCh gekoppelt. Während *GUN4* Mutanten von *Arabidopsis* das Substrat der MgCh nicht akkumulieren (Larkin et al., 2003; Peter und Grimm, 2009), ist eine *gun4* Mutante von *Chlamydomonas* durch die Akkumulation ProtoIX charakterisiert (Formighieri et al., 2012; Brzezowski et al., 2014). Auch die Mutation von *CHLH* in der *Chlamydomonas brs-1* Mutante, *CHLD* in *chld*, oder *CHLI* in *chli* führt zur Akkumulation von ProtoIX (Chekounova et al., 2001; Falciatore et al., 2005; Brzezowski et al., 2014; Brzezowski et al., 2016). MgCh Mutanten von Tabak und *Arabidopsis* hingegen reduzieren die ALA-Synthese und vermeiden so die Akkumulation von TBS-Intermediaten (Abbildung 3.9 und Papenbrock et al. (2000a); Papenbrock et al. (2000b); Mochizuki et al. (2001)). Ein zweiter und im Sinne der Regulation der MgCh-Aktivität durch phosphoryliertes GUN4 vielleicht sogar wichtigerer Aspekt, ist die Tatsache, dass Cyanobakterien, Grünalgen und Gymnospermen neben der lichtabhängigen POR eine licht-unabhängige POR (DPOR) besitzen (Masuda und Takamiya, 2004; Reinbothe et al., 2010). Im Gegensatz zu den Angiospermen, die lediglich die obligat lichtabhängige POR aufweisen, kann die Synthese von Chlorophyllen in evolutionär älteren Organismen auch in der Dunkelheit stattfinden. Im Gegensatz und zur Vermeidung der Akkumulation von phototoxischem Pchl<sub>ide</sub> wird die ALA-Synthese in Angiospermen durch das FLU-Protein in der Dunkelheit gedrosselt (Meskauskiene et al., 2001; Meskauskiene und Apel, 2002; Goslings et al., 2004). Obwohl auch *Chlamydomonas* für ein *FLU-like* (FLP) Protein kodiert (Falciatore et al., 2005), wird der Fluss von TBS-Intermediaten in Cyanobakterien und Grünalgen nur unwesentlich in der Dunkelheit eingeschränkt (zum Beispiel Kada et al. (2003) und Brzezowski et al. (2016)). Folglich ist die kontinuierliche Aktivierung der MgCh (durch GUN4) in diesen Organismen notwendig um ProtoIX in den Chl-Zweig zu leiten. Würde die MgCh-Aktivität durch die Inaktivierung von GUN4 reduziert werden, würde es zu einer Akkumulation von ProtoIX in Cyanobakterien und Grünalgen kommen (Wilde et al., 2004; Sobotka et al., 2008; Brzezowski et al., 2014). In den Angiospermen wird die ALA-Synthese in der Dunkelheit jedoch nicht vollständig reprimiert (Papenbrock et al., 1999; Meskauskiene et al., 2001; Richter et al., 2010). Es wird angenommen, dass die in der Dunkelheit verbleibende ALA-Synthese für die Synthese von Häm notwendig ist. Während die Chl-Synthese lichtinduziert ist, müssen Angiospermen Häm in Phasen mit eingeschränkter Verfügbarkeit von Licht synthetisieren und weiterhin heterotrophen Prozessen zuleiten. In Anbetracht einer im Vergleich zur Ferrochelatase circa 200fach höheren Affinität der MgCh gegenüber ProtoIX (Walker und Willows, 1997), müssen Mechanismen existieren, die die bevorzugte Weiterleitung von ProtoIX in den Häm-Zweig in der Dunkelheit regulieren. Da das Angebot von Vorstufen in der Dunkelheit zusätzlich durch die Repression der ALA-Synthese eingeschränkt ist, gewinnen diese Mechanismen umso mehr an Bedeutung. Ein Teil dieser Regulation soll über die redox-abhängige Aktivität der I Untereinheit der MgCh vermittelt werden. Es wird davon ausgegangen, dass die I Untereinheit in der Dunkelheit in einer oxidierten und inaktiven Form

vorliegt. Folglich ist auch die MgCh-Aktivität reduziert. Im Licht hingegen soll die I Untereinheit, und damit auch der gesamte MgCh-Komplex, durch TRX in den aktiven Zustand überführt werden (Jensen et al., 2000; Ikegami et al., 2007; Luo et al., 2012). Über die von der Photosynthese abhängigen TRX ist die Aktivität der MgCh an den Redox-Zustand des Chloroplasten gekoppelt. So können maximale Aktivität der MgCh im Licht erzielt werden (Papenbrock et al., 1999). Die experimentellen Befunde der vorliegenden Arbeit lassen jedoch den Schluss zu, dass auch die Dephosphorylierung von GUN4 im Licht zur Aktivierung der MgCh beiträgt. In Anwesenheit von phosphoryliertem GUN4 (*gun4-2/GUN4-D*) kann die MgCh im Übergang zur Lichtphase nur eingeschränkt aktiviert werden (Abbildung 3.26). Kurz nach dem Beginn der Belichtungsphase steigen die MgP und MgPMME-Gehalte (Abbildung 3.26) sowie die MgCh-Aktivität (Papenbrock et al., 1999) in WT-Pflanzen auf den im Verlauf eines Tages messbaren Maximalwert. In der zweiten Tageshälfte sinken sowohl die Mg-Porphyringehalte als auch die MgCh-Aktivität wieder (Papenbrock et al., 1999). Im Gegensatz zum WT und *gun4-2/GUN4-I* Linien kann die MgCh-Aktivität, gemessen am MgP-Gehalt, in den *gun4-2/GUN4-D* nur in deutlich vermindertem Umfang zu Beginn des Tages stimuliert werden (Abbildung 3.26). Diese Beobachtung ist ein eindeutiger Hinweis dafür, dass GUN4 im Licht in dephosphorylierter Form vorliegen muss, um den optimalen Aktivierungszustand der MgCh zu erreichen.



**Abbildung 4.4: Schematischer Verlauf und Modell zur Regulation von GUN4 in Angiospermen.**

(A) Schematische Darstellung des Verlaufes der ALA-Syntheseaktivität (Rot), *steady state* Gehalte von MgP (Grün), Pchlride (schwarze unterbrochene Linie) und Phosphorylierung von GUN4 (Orange) im Tag-Nacht-Rhythmus. (B) Modell zur Regulation der MgCh-Aktivität durch GUN4-Phosphorylierung im Licht und Dunkel.

In einem allumfassenden Bild kann die Regulation der MgCh-Aktivität durch GUN4-Phosphorylierung wie folgt zusammengefasst werden (Abbildung 4.4): In Pflanzen führt die Lichtinduktion der ALA-Syntheseaktivität zur schnellen Erhöhung von Intermediatgehalten innerhalb des Chl-Zweiges (z.B. MgP, Abbildung 4.4). In dieser Phase wird die MgCh durch dephosphoryliertes GUN4 maximal stimuliert. Im Übergang zur Dunkelheit wird die ALA-Synthese durch FLU und akkumulierendes Pchlride reprimiert. Gleichzeitig sinken die MgP-Gehalte unter den Lichtwert und gehen vollständig im Pchlride-Pool auf (Abbildung 4.4 A). Die reduzierten MgP-Gehalte induzieren die Phosphorylierung von GUN4 in der Dunkelheit. Hierdurch werden GUN4 und die MgCh inaktiviert und das in der Dunkelheit gebildete ProtoIX kann in den Häm-Zweig geleitet werden (Abbildung 4.4 B). Beim erneuten Übergang in die Lichtphase setzt die lichtabhängige POR Pchlride zu Chlide um, die Hemmung der ALA-Synthese wird aufgehoben und die Gehalte von MgP steigen (Abbildung 4.4 A). Die erhöhten MgP-Gehalte sind das Signal zur Inhibierung der GUN4-Phosphorylierung. Die reduzierte Phosphorylierung überführen GUN4 und somit auch die MgCh im Licht in den aktiven Zustand (Abbildung 4.4 B). Möglicherweise wird der Aktivierungsvorgang im Licht durch eine (GUN4-spezifische) Phosphatase unterstützt.

Mit dem präsentierten Modell zum Einfluss der Phosphorylierung auf die Funktion von GUN4 wird ein neuer Mechanismus zur post-translationalen Regulation der MgCh-Aktivität in Angiospermen vorgeschlagen. Dieser Mechanismus basiert auf der Aktivitätskontrolle von GUN4 durch eine Proteinkinase und dient der Kontrolle der Intermediatflüsse innerhalb des Stoffwechselweges. Mit den gezeigten Ergebnissen wird das regulatorische Netzwerk der TBS um den Aspekt der Proteinphosphorylierung ergänzt.

## 4.2 Die Identität der GUK bleibt zunächst im Verborgenen

Die Analyse der GUN4-Phosphorylierung mit Extrakten von Proteinkinase-Mutanten ergab, dass GUN4 durch keine der hier analysierten bekannten Proteinkinasen phosphoryliert wird. Weder die STATE TRANSITION KINASEN 7 und 8 (STN7/8, Bellaïre et al. (2005); Bonardi et al. (2005); Wunder et al. (2013a); Wunder et al. (2013b)), die CHLOROPLAST SENSOR KINASE (CSK, Puthiyaveetil et al. (2008)) noch die THYLAKOID ASSOCIATED KINASE 1 (TAK1, Snyders und Kohorn (1999); Snyders und Kohorn (2001)) sind für die Phosphorylierung von GUN4 verantwortlich (Abbildung 3.49). Auch ist es unwahrscheinlich, dass die stromal lokalisierte CASEIN KINASE 2 für die Phosphorylierung von GUN4 verantwortlich ist (Abbildung 3.56 und folgender Abschnitt). Von der CKII ist bekannt, dass sie vorzugsweise Aminosäuren, die in ein „saures“ Peptidmotiv eingebettet sind (Anreicherung von Aspartat und Glutamat), phosphoryliert (Reiland et al., 2009). Daher ist es möglich, aus den Eigenschaften der Aminosäuren, die die Phosphorylierungsstelle eines Phosphoproteins umgeben, Rückschlüsse auf die phosphorylierende Proteinkinase zu ziehen. GUN4-Homologe der Angiospermen werden in einer konservierten Sequenz von „KP/TD/NYSF“ phosphoryliert (Abbildung 3.39). Obwohl dieses C-terminale Motiv auch in Phosphopeptiden der ribosomalen Proteine aus Plastiden überrepräsentiert ist, ist die Proteinkinase bisher nicht bekannt (Reiland et al., 2009). Folglich kann anhand der Phosphorylierungsstelle von GUN4, bzw. deren Aminosäure-Kontext, keine Vorhersage für einen möglichen GUK-Kandidaten getroffen werden.

Um die Identität der GUK dennoch zu entschlüsseln, wurden umfangreiche Versuche zur Isolation der GUK aus Plastidenextrakten von *Arabidopsis* durchgeführt. In Fraktionen einer Größenausschluss-Chromatographie (SEC) und eines Saccharosedichte-Gradienten (SDG) von *Arabidopsis* Chloroplasten wurden mögliche GUK-Kandidaten mittels Massenspektrometrie identifiziert (Tabelle XIX, S.205). Zusätzlich wurde eine mit GUN4 co-exprimierte Proteinkinase identifiziert (PKU13). Für sechs dieser als Proteinkinasen annotierte Proteine konnte eine plastidäre Lokalisation gezeigt werden (Abbildung 3.53). Daher waren die PKU1, 2, 3, 5, 12 (ABC1K9) und 13 mögliche Kandidaten für die GUK. Zusätzlich fanden sich die bereits bekannten und in den Plastoglobuli der Plastiden lokalisierten ABC1K1 und ABC1K3-Kinasen (Ytterberg et al., 2006; Lundquist et al., 2012; Lundquist et al., 2013) in SEC- und SDG-Fractionen mit GUK-Aktivität (Tabelle XIX, S.205). GUN4-Kinaseassays mit den heterolog exprimierten und aufgereinigten PKUs, die eine eindeutige Proteinkinaseaktivität gegen plastidäre Proteine zeigten (PKU1 und 3, Abbildung 3.55), ergaben einen interessanten Befund. Sowohl die PKU1 und PKU3 als auch die CKII waren in der Lage einen Phosphatrest auf rekombinantes GUN4 zu übertragen (Abbildung 3.56). Jedoch lag die Stärke der Phosphorylierung von GUN4 durch die aufgereinigten Kinasen weit unterhalb der Intensität wie sie durch den Einsatz eines *Arabidopsis*-Extraktes erzielt wurde. Im quantitativen Vergleich der im Bereich von

Mikrogramm eingesetzten rekombinanten Kinasen und den wesentlich geringeren Mengen der GUK im Plastidenextrakt muss von einem falsch positiven Ergebnis ausgegangen werden. Offensichtlich führt das Überangebot einer rekombinanten Kinase in einem *in vitro* Assay zur unspezifischen Phosphorylierung eines Substrates. Kinaseassay mit Extrakten von *pku*, *abc1k3*, *abc1k1/3* Mutanten bestätigten, dass keine der putativen GUK-Kandidaten für die Phosphorylierung von GUN4 verantwortlich ist. Trotz verringerter Transkriptgehalte der PKUs (Abbildung 3.57 bis Abbildung 3.61) und des *knockouts* von *ABC1K1* und *ABC1K3* (Lundquist et al., 2013) konnte das GUN4 durch Extrakte der Mutanten phosphoryliert werden (Abbildung 3.62). Betrachtet man die jeweils unterschiedliche sub-plastidäre Lokalisierung von GUN4 (Thylakoidmembran, Abbildung 3.2) und den ABC1-Kinasen (Plastoglobuli, Lohscheider et al. (2016)) ist es allein aufgrund der Kompartimentierung unwahrscheinlich, dass die ABC1K1 oder ABC1K3 an der Regulation des GUN4 beteiligt sind.

Die Identität der GUK blieb somit bis zum Abschluss dieser Arbeit im Verborgenen. Erst zukünftige Experimente werden zur Aufklärung der Natur der GUK beitragen können. Wenngleich die Isolation von Fraktionen mit GUK-Aktivität erfolgreich war, scheinen die zu geringen Mengen der GUK der limitierende Faktor für die massenspektrometrische Detektion zu sein. In Ergänzung zu den hier gewählten Ansätzen könnten weitere Trenn- und Anreicherungstechniken genutzt werden. Denkbar wäre eine zusätzliche Anreicherung der GUK aus positiv getesteten Fraktionen der SEC (zum Beispiel durch anschließenden *pull down* gegen GUN4 oder ATP-Agarose). In der Erwartung, Fraktionen höherer Reinheit zu isolieren, könnte ein Chloroplastenextrakt auch mittels Ionenaustausch-Chromatografie aufgetrennt und die Fraktionen hinsichtlich des Vorhandenseins der GUK analysiert werden.

#### **4.2.1 Exkurs: die Identifizierung der PLASTID PROTEIN KINASE WITH UNKNOWN FUNCTION (PKU)**

Wenngleich die PKUs nicht in einen physiologisch relevanten Zusammenhang mit der GUN4-Phosphorylierung zu bringen sind, soll an dieser Stelle ein kurzer Abschnitt zu diesen vormals unbekannten plastidären Proteinkinasen folgen.

Mit Ausnahme der PKU13 waren alle PKUs als *protein kinase family protein* oder *protein kinase* (TAIR10) annotiert. Obwohl PKU13 als *amino acid kinase family protein* annotiert wurde, hat dieses Protein eine größere Ähnlichkeit zu Uridylat-Kinasen. Diese Phosphotransferasen sind in die Synthese von Uridin-Diphosphat (UDP) aus Uridin-Monophosphat (UMP) involviert. Tatsächlich findet sich in den Beschreibungen und Klassifizierungen dieses Proteins in den einschlägigen Datenbanken (TAIR10, NCBI) der Hinweis auf die funktionelle Zuordnung als UMP-Kinase. Die verbleibenden PKU1, 2, 3, 5 und 12 können aufgrund der Konservierung von Proteinkinase-Domänen eindeutig als



Proteinkinasen eingestuft werden (Abbildung 4.5). An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass die PKU12 zuvor als plastoglobuläre ABC1K9 identifiziert (Ytterberg et al., 2006), jedoch bis dato nicht korrekt annotiert wurde (TAIR10).

	Domäne I	Domäne II	Domäne VI	Domäne VII
STN7	VVGKRLGEGSGGVVYKVSLSKKR	RSNEEGEYVLKKATEYGAVE	STGIIHRDVKPQNIIFSE	SFKIIDLGAAADL
cpCKII	EVVRKVGRCYSEVFEGIHATDN	CVIKILKPVKKKIKREIKI	SRGIMHRDVKPHNVMIH	KLRLTDWGLAEFY
ABC1K1	ISPEFVAAASLGQVYQARIIRSG	RLRRSGKVAVKVQRPVRA	EYGFYHADPHGPNFLRTY	KLAFDFGMMSET
ABC1K2	VSPEPIAAASLGQVYKAQLRYSG	QLRYSGQVAVKVQRPGIEE	EYGFYHADPHGPNLLATP	QLAYDFGMMGDF
PPK	LKHRESGDEGSGCRIVNSRGRNR	QGPFRGTPVVFQVYPGQAG	DNDRLHQSLGESSIVLNT	IPRLRLAFSVDI
PKU1	SDELRIGVGGYGSVYRCNLHHTT	RCNLHHTTAVVKMLHSDKSS	PRPIVHRDLKPEANILLDR	VSKIGDVGLSKMV
PKU2	SDENKLGEGGFGPVYKGLNLNGE	GKLLNGEEVAKRLSLASGQ	RLKVIHRDIKASNILLDE	NPKISDFGLARIF
PKU3	DINNLLGRGSHGSAVYKAVIGSRH	KAVIGSRHIAVKRPSKSREI	ETPIIHRDIKASNVLMDK	NAKLGDGFLAIRC
PKU5	TQITKIGSVGGGCINLASHYQTD	HYQTDAGSFFVKTNRSIGPA	EPCLLHGDLWSGNIAYDK	EPVILDPACYYGH
(ABC1K9) PKU12	VDPTPIASASIAQVHGARRIRGSQ	RLRGSQEDVVIKVLKPGIED	ACESFHADVHAGNLWLRL	RIGFDDFGIVGRI
	<b>GXGXXG</b>	<b>VXXK</b>	<b>HXD</b>	<b>DXG</b>

**Abbildung 4.5: Alignment der Aminosäuresequenz bekannter und neu identifizierter PLASTID PROTEIN KINASE WITH UNKNOWN FUNCTION (PKU).**

Das Alignment beschränkt sich auf eine Auswahl von Domänen die wichtig für eine Proteinkinaseaktivität sind. Die in Proteinkinasen konservierten Aminosäuren jeder Domäne sind farblich hervorgehoben. Zum Vergleich sind Sequenzen bekannter Proteinkinasen gezeigt. Das Alignment erfolgte in Anlehnung an Bayer et al. (2012) und wurde in (Richter et al., 2016a) veröffentlicht. Die PKU13 ist nicht gezeigt, da sie zwar als *amino acid kinase family protein* annotiert wurde (TAIR10), aber tatsächlich eine größere Ähnlichkeit zu Uridylat-Kinasen hat.

Ein wesentliches Merkmal von Proteinkinasen ist die Existenz von konservierten Domänen, die für die Phosphorylierung eines Zielproteins notwendig sind (Hanks et al., 1988). Dabei spielen insbesondere die Domänen I, II, VI und VII, bzw. die in ihnen konservierten Aminosäuren, eine wesentliche Rolle für die katalytische Aktivität der Proteinkinase. Mit Ausnahme der PKU5 und PKU12 (ABC1K9) sind in der Domäne I der PKU1, 2 und 3 alle für die Bindung des Phosphatgruppendonors ATP notwendigen Aminosäuren vorhanden (Abbildung 4.5, GXGXXG, „*phosphate gripper*“). In PKU5 und 12 sind diese Motive teilweise mutiert, sodass über eine eingeschränkte Bindung des ATP spekuliert werden könnte. Dies könnte auch die Ursache für das Ausbleiben einer messbaren Proteinkinaseaktivität gegenüber plastidären Proteinen in einem *in vitro* Kinaseassay sein (Abbildung 3.55). Dem steht jedoch gegenüber, dass für die ebenfalls in Domäne I mutierten CKII und ABC1K1/2 eine Proteinkinaseaktivität belegt ist (Abbildung 3.55 und Baginsky et al. (1999); Ogrzewalla et al. (2002); Martinis et al. (2014); Lu et al. (2015a)). Die für den Phosphatgruppentransfer wichtigen und an der ATP-Bindung beteiligten Aminosäuren der verbleibenden Proteinkinase-Domänen finden sich in allen identifizierten PKUs (Abbildung 4.5).

Wie auch die rekombinante CKII können die PKU1 und PKU3 den Phosphatgruppentransfer auf plastidäre Proteine in einem *in vitro* Kinaseassay katalysieren (Abbildung 3.55). Wenngleich nicht ausgeschlossen werden kann, dass PKU5 und PKU12 eine andere Substratspezifität haben (zum Beispiel GTP als Phosphatgruppendonor), können auf Basis der hier gewählten experimentellen Bedingungen nur die PKU1 und PKU3 eindeutig als Proteinkinasen klassifiziert werden. Aufgrund der

Limitation in der Erzeugung des rekombinanten Proteins (Abbildung 3.54), können für die PKU2 keine Aussagen bezüglich einer möglichen Aktivität getroffen werden.

Die charakterisierten *pku* Mutanten lieferten zunächst keinen Hinweis auf eine mögliche Funktion der PKUs in einem plastidären Signal- oder Stoffwechselweg (Abschnitt 3.10, S.195). Für die beiden PKUs mit nachgewiesener Proteinkinaseaktivität (PKU1 und 3) lassen sich dennoch erste Aussagen über eine mögliche Funktion treffen. Expressionsanalysen (eFP-Browser, Winter et al. (2007)) zeigen, dass *PKU3* eine Induktion unter osmotischem Stress erfährt. Die Expression von *PKU1* wird hingegen in der Dunkelheit oder Schwachlicht, sowie als Antwort auf biotische (Pathogene) und abiotische (UV-B-Strahlung) Stressbedingungen induziert. Mit zwei Ausnahmen zeigten alle *pku* Mutanten ein WT-artiges Wachstum unter den hier gewählten Bedingungen (Abbildung 3.57 bis Abbildung 3.61). Die besagten Ausnahmen betreffen die *pku2-1* und *pku12-2*, die ein vom WT unterschiedlichen, ausgebleichenen und wachstumsverzögerten Phänotyp zeigten (Abbildung 3.58 und Abbildung 3.61). Da jedoch für die *PKU2* und *PKU12* weitere Mutantenlinien mit unverändertem Wachstum existieren, kann davon ausgegangen werden, dass der Phänotyp der *pku2-1* und *pku12-2*-Linien durch eine zusätzliche T-DNA-Insertion in einem weiteren Gen bedingt wird.

In der Zusammenfassung lässt sich festhalten, dass im Rahmen der vorliegenden Arbeit vier neue, vormals nicht bekannte, plastidäre Proteine mit Proteinkinase-Annotation isoliert wurden. Für zwei dieser konnte eine Proteinkinaseaktivität nachgewiesen werden. Daher leisten die vorliegenden Untersuchungen einen wesentlichen Beitrag zur Identifizierung weiterer Proteinkinase-Substrat-Wechselbeziehungen in den Chloroplasten. Denn, wie bereits einleitend erwähnt, existiert eine große Lücke zwischen den bisher identifizierten plastidären Phosphoproteinen (je nach Quelle circa 300) und den zugehörigen Proteinkinasen (23) (Bayer et al., 2012; van Wijk et al., 2014; Baginsky, 2016; Richter et al., 2016a). Mit der Identifizierung der hier beschriebenen PKUs ist nun die Möglichkeit gegeben, die funktionelle Beschreibung einzelner Proteinkinase-Substrat-Interaktionen weiter voranzutreiben. In Zukunft sollte die Identifizierung einzelner Zielproteine dieser neuen PKUs im Vordergrund stehen. Neben den „klassischen“ Methoden (*pulldown*, *reverse genetics*) könnte ein kürzlich vorgestellter Peptid-Mikroarray zur Aufklärung möglicher Zielproteine von PKU1 und PKU3 dienen. Auf dem als „ChloroPhos1.0“ eingeführten Peptid-Mikroarray sind Peptide aus 15 Aminosäuren, die ein zuvor identifiziertes (plastidäres) Phosphopeptid repräsentieren, immobilisiert (Schönberg et al., 2014). Diese Peptide können durch eine aufgereinigte Proteinkinase phosphoryliert werden und so das Spektrum möglicher Zielproteine eingegrenzt werden. Da die rekombinanten PKU1 und PKU3 eine *in vitro* Proteinkinase-aktivität aufweisen, sollte der Versuch unternommen werden, einzelne Substrate der PKU1 und PKU3 mit Hilfe des Peptid-Mikroarray zu isolieren und eingehender zu studieren.

### 4.3 Eine zusätzliche post-translationale Modifikation beeinflusst die

#### Eigenschaften und Funktion von GUN4

Im Rahmen von Experimenten zum *Arabidopsis* GUN4 wurden für GUN4 drei immunoreaktive Banden in Western-Blot-Analysen nachgewiesen (Larkin et al. (2003); Peter und Grimm (2009) und diese Arbeit). Obwohl die Aufspaltung von GUN4 in drei Protein-Versionen offensichtlich einzigartig für Proteine der TBS zu sein scheint, wurden bisher keine Erkenntnisse zur Identität der zu Grunde liegenden Modifikation(en) veröffentlicht. Eine genaue Analyse des Verteilungsmusters ergab, dass GUN4 in einer dominanten Form (Bande B), sowie zwei weniger abundanten Formen in einem Proteinextrakt von im Licht gewachsenen *Arabidopsis* Pflanzen detektiert werden kann. Eine der GUN4-Formen zeigte ein langsames (Bande A) und eine weitere Form ein schnelleres (Bande C) Migrationsverhalten in einem SDS-Gel (Abbildung 3.63). Im Vergleich zur dominanten GUN4-Bande B läuft Bande A entsprechend einer Zunahme des Molekulargewichtes von in etwa 0,5-1 kDa. Bande C hingegen entsprechend einer Abnahme von 1-2 kDa. Das Vorläufer-Polypeptid von GUN4 ist mit einem Unterschied des Molekulargewichtes von circa 7 kDa deutlich von diesen reifen GUN4-Spezies (ohne Transitpeptid) abzugrenzen (Adhikari et al., 2009). Interessanterweise verschiebt sich das Verteilungsmuster der drei GUN4-Banden in unterschiedlichen Anzuchtbedingungen (Abbildung 3.63). Folglich könnte über eine spezifische Funktion dieser GUN4-Formen in bestimmten physiologischen Situationen spekuliert werden (siehe unten). Die deutlichsten Veränderungen des Bandenmusters wurden in Extrakten von *Arabidopsis* Pflanzen, die unter Kältestress angezogen wurden, im Wechsel von der Dunkelheit zum Licht (De-etiolierung), sowie nach verlängerter Dunkelinkubation beobachtet (Abbildung 3.63 und Abbildung 3.64). In etioliertem Gewebe liegt GUN4 zu gleichen Teilen als Bande B und C vor. Im Übergang zum Licht etabliert sich das „Licht-Muster“ mit der dominanten Bande B, gefolgt von A und nur geringen Mengen der GUN4-Version die durch Bande C repräsentiert wird (Abbildung 3.63). Im Zuge der Dunkelinkubation ist ein gegenläufiger Prozess zu beobachten. Zunächst nimmt die Intensität der Bande A ab. Anschließend reduziert sich der Gehalt der dominanten GUN4-Form (Bande B), sodass schließlich nur noch die durch Bande C repräsentierte GUN4-Form nach längerer Dunkelinkubation detektiert werden kann. Aus diesen Befunden lässt sich ableiten, dass es einen Zusammenhang zwischen Lichtangebot und dem Auftreten der GUN4-Versionen gibt. Wenngleich die *gun4-2/GUN4-D* bereits im Licht eine deutliche Anreicherung der Bande C zeigten (Abbildung 3.64), ist es wichtig zu betonen, dass die Phosphorylierbarkeit von GUN4 keine Voraussetzung für das Auftreten der GUN4-Formen ist (Abbildung 3.64 und Abbildung 3.65). Das Vortäuschen der Phosphorylierung scheint die Bildung der durch Bande C repräsentierten GUN4-Form im Licht *in vivo* zu begünstigen.

Interessanterweise konnten alle drei GUN4-Spezies durch die Inkubation von rekombinantem GUN4 mit Thylakoidextrakten erzeugt werden. Da die Bildung der (rekombinanten) GUN4-Spezies nur durch einen nativen Chloroplastenextrakt hervorgerufen werden kann (Abbildung 3.65), muss von der Existenz einer GUN4-modifizierenden Aktivität innerhalb der Extrakte ausgegangen werden. Dies ist im Einklang mit den Befunden von Adhikari et al. (2009), die zeigen konnten, dass die Modifikation(en) erst nach dem Import von *in vitro* translatiertem GUN4 in Chloroplasten auftreten. Folglich ist die zusätzliche GUN4-Modifikation auf eine enzymatische Aktivität innerhalb von Chloroplasten zurückzuführen. Zusätzlich zur Phosphorylierung erfährt das GUN4 demnach eine weitere post-translationale Modifikation.

Nach der Auftrennung der Assayansätze akkumuliert Bande A und ein Teil der dominanten Bande B in der Membranfraktion. Ein weiterer Teil der Bande B, sowie die Bande C konnten ausschließlich in der löslichen Fraktion des Assays detektiert werden (Abbildung 3.65). Dies deutet auf eine durch die zusätzliche Modifikation(en) induzierte Veränderung der Affinität des GUN4 gegenüber der Thylakoidmembran hin. Dieser Befund könnte im direkten Zusammenhang mit der Stimulation der MgCh durch GUN4 stehen (siehe Abschnitt 4.1.3, S.263 und Adhikari et al. (2009); Adhikari et al. (2011)).

Im quantitativen Vergleich zur löslichen Fraktion eines *in vitro* Assay fällt die Akkumulation der GUN4-Spezies in den Thylakoiden um den Faktor 5-10 geringer aus. Die GUN4-Spezies der löslichen Fraktion sind bereits nach Färbung von SDS-Gelen sichtbar (Abbildung 3.66). Daher konnten nur die Banden B und C aus einem Proteingel extrahiert und per Massenspektrometer analysiert werden. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass für das GUN4 der Bande C sowohl der N-Terminus (HIS-tag Antikörper), als auch der phosphorylierte C-Terminus (pGUN4-Antikörper) nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3.65). Folglich ist die schnellere Migration der Bande C keine Folge einer N- oder C-terminalen Verkürzung des GUN4. Vielmehr geht aus der massenspektrometrischen Analyse hervor, dass die durch die Bande C repräsentierte GUN4-Form möglicherweise eine Modifikation in einem konkreten GUN4-Bereich (Position 115-123) aufweist (Abbildung 3.67). Das Peptid "RGYVFFSEV", welches als mögliche Stelle für eine zusätzliche Modifikation dienen könnte, ist in Angiospermen zu 100% konserviert. Teile des Peptides (RXXXXFXXV) sind in allen analysierten GUN4-Homologen konserviert (Abbildung 3.68). Über die Identität der Modifikation konnte zunächst keine Aussage getroffen werden. Auch konnte die Eingrenzung des modifizierten Bereiches des GUN4 nur indirekt erfolgen. Das besagte Peptid war in der massenspektrometrischen Analyse der GUN4-Spezies der Bande C unterrepräsentiert. Dies ist mit dem Umstand zu erklären, dass die Peptide mit unbekannter Modifikation im Rahmen der computergestützten Auswertung der Peptid-Spektren wahrscheinlich nicht dem GUN4-Protein zugeordnet werden konnten (siehe Abschnitt 3.11.5, S.229).

Der modifizierte Bereich des GUN4 enthält Aminosäuren, die bekannte Ziele für PTM sind (Friso und van Wijk, 2015). In einem Versuch, die modifizierte Aminosäure zu identifizieren, wurde das Tyrosin an Position 117 (Y117) als mögliches Ziel der zusätzlichen post-translationalen Modifikation identifiziert. Proteinextrakte des Tabaks, der zwei punktmutierte GUN4-Proteine (Y117S und Y117) transient exprimiert, enthält lediglich die GUN4-Spezies, die durch die Banden A und B repräsentiert werden (Abbildung 3.70). Der *knockout* des Tyrosins hat somit möglicherweise einen Einfluss auf die Modifikation, die zur GUN4-Spezies der Bande C führt.

#### 4.3.1 Hinweise zur Art der zusätzlichen post-translationalen Modifikation

Tyrosine sind mögliche Ziele für Phosphorylierung. Tatsächlich könnte die zusätzliche negative Ladung einer Phosphatgruppe am Y117 zu einer schnelleren Migration des GUN4s im SDS-Gel führen. Die *in vitro* Analysen zur Phosphorylierung von GUN4 zeigten jedoch, dass GUN4 nur an einer Aminosäure phosphoryliert wird (Abbildung 3.2). Zusätzlich wird die Existenz von Tyrosin-Phosphorylierung an plastidären Proteinen kontrovers diskutiert (Lu et al., 2015b; Baginsky, 2016). Neben der Phosphorylierung können Tyrosine sulfatiniert werden. Bei dieser Art der post-translationalen Modifikation wird ein Sulfat-Rest an die OH-Gruppe des Tyrosins geknüpft (Yang et al., 2015). Als Sulfatgruppen-Donor dient dabei 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat (PAPS), welches sowohl im Cytosol, als auch den Chloroplasten gebildet und zwischen den Kompartimenten ausgetauscht werden kann (Gigolashvili et al., 2012; Gigolashvili und Kopriva, 2014). Die plastidäre Synthese von PAPS ist für die normale Entwicklung von Pflanzen notwendig (Mugford et al., 2010) und steht im direkten Zusammenhang mit der retrograden Kommunikation unter abiotischen Stressbedingungen (Estavillo et al. (2011) und Einleitung – Abschnitt 1.8, S.57). Die Sulfatierung von Tyrosinen wird durch Tyrosylprotein-Sulfotransferasen (TPST) katalysiert (Yang et al., 2015), welche in Pflanzen bisher nur im Golgi-Apparat identifiziert wurden. Dort modifizieren TPSTs unter anderem sekretorische Proteine und Peptidhormone, deren biologische Aktivität und Protein-Protein-Interaktionen mit anderen Partnern durch die Sulfatierung maßgeblich beeinflusst werden (Kehoe und Bertozzi, 2000; Komori et al., 2009; Moore, 2009; Gigolashvili und Kopriva, 2014). Die Abwesenheit von plastidären TPST und die Tatsache, dass sich in der Literatur keine Hinweise auf plastidäre Proteine mit Tyrosin-Sulfatierung finden lassen, sprechen gegen diese Art der post-translationalen Modifikation an GUN4. Im Gegensatz zur Sulfatierung gibt es hingegen experimentelle Belege für die Existenz einer weiteren Tyrosin-Modifikation an plastidären Proteinen. Die als Nitrierung von Tyrosinen bekannte Modifikation wurde sowohl an Proteinen aus Gesamtextrakten von *Arabidopsis* (Lozano-Juste et al., 2011) als auch in Thylakoidpräparationen (Galetskiy et al., 2011; Takahashi et al., 2015) identifiziert. Die Tyrosin-Nitrierung soll einen Einfluss auf die Stabilität, Aktivität und Interaktionsfähigkeit eines Proteins haben. Aus der Reaktion von

Tyrosin mit Peroxinitrit, einer reaktiven Stickstoffverbindung (RNS), geht Nitrotyrosin hervor. Dieses ist negativ geladen und hydrophil (Lehtimäki et al., 2015). Das Peroxinitrit selbst wird durch die Reaktion von Stickstoffmonoxid mit Superoxid gebildet und soll spontan mit der Seitengruppe des Tyrosins reagieren (Lozano-Juste et al., 2011; Lehtimäki et al., 2015; Takahashi et al., 2015). Es wird angenommen, dass Peroxinitrit in einem nicht regulierten und nicht selektiven Mechanismus mit Tyrosin reagiert. Eine aktuelle Studie konnte jedoch zeigen, dass die Tyrosin-Nitrierung hochgradig selektiv an plastidären Proteinen vollzogen wird (Takahashi et al., 2015). Interessanterweise führt die Nitrierung eines Proteins zu einem veränderten Laufverhalten im SDS-Gel, welches vergleichbar mit dem von GUN4 ist (zum Beispiel Abbildung 3.63). Die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), die Fructose-Bisphosphatase (FBPase) und Carboanhydrase (CA) zeigen in Abhängigkeit von der Anzahl der Nitrotyrosine mindestens zwei immunoreaktive Banden in einem Proteinextrakt von *Arabidopsis* (Lozano-Juste et al., 2011). Auch erfüllt das möglicherweise modifizierte Y117 von GUN4 die (strukturellen) Voraussetzungen für eine Nitrierung: Nitrierung findet an Tyrosinen statt, die in einer gut zugänglichen flexiblen Schleife an der Oberfläche des Proteins (siehe folgender Abschnitt 4.3.2, S.283) im Kontext einer in der Nähe befindlichen negativen Ladung (Aspartat (D) oder Glutamat (E)) lokalisiert sind (Lozano-Juste et al., 2011). Auffällig ist, dass das GUN4-Homolog aus *Chlamydomonas*, welches das Y117 nicht besitzt (Abbildung 3.68), nur eine immunoreaktive GUN4-Bande in einem Zellextrakt zeigt (Brzezowski et al., 2014). Zusätzlich zu den strukturellen Merkmalen und dem veränderten Migrationsverhalten im SDS-Gel, würde auch der inhibierende Einfluss von reduzierenden Agenzien auf die Bildung der verschiedenen GUN4-Spezies für einen Zusammenhang zwischen Redox-Zustand (ROS/RNS-Gehalt) und GUN4-Modifikation sprechen (Abbildung 3.3 und Abbildung 3.66). Dem steht jedoch gegenüber, dass das Auftreten der Bande C sowohl im Licht (vermutlich erhöhte Produktion von ROS) und Dunkelheit beobachtet wurde (Abbildung 3.3).

Da jedoch bereits POR und die D Untereinheit der MgCh als mögliches Ziel für Tyrosin-Nitrierung identifiziert wurden (Lozano-Juste et al., 2011), verdichten sich die Hinweise, dass diese post-translationale Modifikation einen physiologischen Einfluss auf die Proteine der TBS ausüben kann. Wenngleich die massenspektrometrische Analyse keinen Hinweis auf Nitrotyrosin im GUN4 ergab, könnte der Versuch unternommen werden Nitrotyrosine dennoch im GUN4 nachzuweisen. Eine der simpelsten Methoden wäre dabei die Anwendung eines für Nitrotyrosin spezifischen Antikörpers. Dieser wurde in der Vergangenheit erfolgreich zur Anreicherung und dem Nachweis von Tyrosin-Nitrierung in pflanzlichen Proteinen genutzt (Lozano-Juste et al., 2011).

Weitere Experimente können zur Aufklärung der zusätzlichen Modifikation von GUN4 beitragen. Zum einen sollten Punktmutanten von GUN4 mit einem Austausch des Y117 in einem *in vitro* Assay mit Thylakoidextrakten inkubiert werden. Zusätzlich zur *in vivo* Expression von GUN4(Y117F) und

GUN4(Y117S) in Tabakblättern, könnte so das Tyrosin als modifizierte Aminosäure bestätigt werden. Die nicht-zielgerichtete Suche nach Chemikalien, die die Modifikation von GUN4 verhindern, kann eine Auskunft über Substratspezifitäten und die weiteren Eigenschaften des modifizierenden Enzyms geben. Auch der auffällige Befund, dass Phosphatase (PPase)-Inhibitoren die Modifikation von GUN4 im Licht inhibieren (Abbildung 3.6), sollte weiter verfolgt werden. Die verwendeten Mixturen aus verschiedenen Chemikalien enthalten eine gemeinsame Substanz: Natriumorthovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ). Diese Substanz hemmt spezifisch die Dephosphorylierung von Phospho-Tyrosin (Gordon, 1991; Huyer et al., 1997). Da die Phosphorylierung am Y117 des GUN4 ausgeschlossen werden konnte (siehe oben), könnte das GUN4-modifizierende Enzym, wie auch die GUN4-Kinase (siehe Abschnitt 4.1.1, S.257), durch die Aktivität von Phosphatasen beeinflusst zu werden. Diese Annahme wurde den zuvor beobachteten Zusammenhang zwischen GUN4-Phosphorylierung und zusätzlicher Modifikation unterstützen (siehe oben, *gun4-2/GUN4-D* Linien). In einem weiterführenden Experiment sollte überprüft werden, ob tatsächlich Natriumorthovanadat oder eine andere Komponente der PPase-Inhibitor-Mixturen für die Hemmung der zusätzlichen GUN4-Modifikation verantwortlich ist. Analog zur Identifizierung der GUN4-Kinase (Abschnitt 3.10, S.195) sollte der Versuch unternommen werden, das für die Modifikation verantwortliche Enzym mittels chromatographischer Methoden aus einem *Arabidopsis*-Extrakt anzureichern und anschließend durch massenspektrometrische Analysen zu identifizieren.

Unabhängig von der Art der zusätzlichen post-translationalen Modifikation, konnten im Rahmen dieser Arbeit erste Hinweise für die Funktion der zusätzlichen Modifikation an GUN4 gewonnen werden. Auf diese soll im folgenden Abschnitt näher eingegangen werden.

#### **4.3.2 Zusammenhang zwischen zusätzlicher GUN4-Modifikation und Stimulation der MgCh**

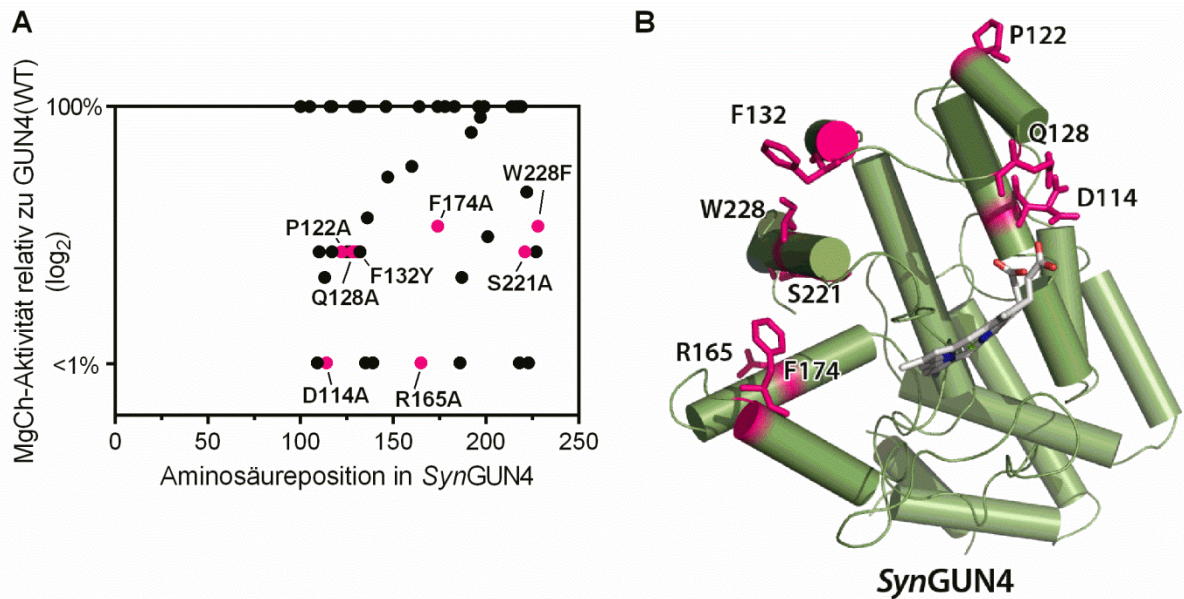
Es wurde vermutet, dass die zusätzliche Modifikation von GUN4 in einem funktionellen Zusammenhang mit der Fähigkeit die MgCh zu stimulieren steht. Um sich dieser Vermutung zu nähern, wurden GUN4-Proteine mit Thylakoidextrakten inkubiert. Anschließend wurden diese aus dem löslichen Teil des Assayansatz aufgereinigt und in einen *in vitro* MgCh-Assay eingesetzt (Abbildung 3.71). Beide, das GUN4(WT) und GUN4(S264I)-Protein, lagen nach der Inkubation in modifizierter (Bande C) und nicht-modifizierter (Bande B) Form vor. Die Aufspaltung in die zwei GUN4-Spezies führte zu einer Abnahme der Stimulationsfähigkeit der MgCh-Reaktion *in vitro* (Abbildung 3.71). Demnach könnte die zusätzliche Modifikation von GUN4, wie auch schon die Phosphorylierung, eine Determinante der Stimulation der MgCh-Reaktion durch GUN4 sein. Überträgt man dieses Ergebnis auf die Wachstumsbedingungen, in denen die Modifikation in

*Arabidopsis*-Pflanzen beobachtet werden konnte (Abbildung 3.63), lässt sich eine physiologische Signifikanz für die GUN4-Modifikation ableiten: in der Dunkelheit liegt GUN4 (teilweise) in der modifizierten Form (Bande C) vor und hat daher eine geringere Stimulation der MgCh zur Folge. Im Licht hingegen korreliert die relative Abnahme der modifizierten GUN4-Spezies (Bande C) mit der lichtabhängigen Aktivierung der TBS im Allgemeinen und der MgCh im Speziellen (Papenbrock et al., 1999). Damit steht die zusätzliche Modifikation von GUN4 im direkten Zusammenhang mit der Inaktivierung der MgCh in der Dunkelheit (siehe Abschnitt 4.1.5, S.270).

Wie beeinflusst die zusätzliche Modifikation aber die Funktion von GUN4? Zur Beantwortung dieser Frage können veröffentlichte Daten zum GUN4 aus *Synechocystis* und eine vorhersagte 3D-Struktur von *Arabidopsis* GUN4 herangezogen werden.

Umfangreiche Studien an cyanobakteriellem GUN4 (Davison et al., 2005; Verdecia et al., 2005; Kopečna et al., 2015) ermöglichen es einen Zusammenhang zwischen den einzelnen Aminosäuren des GUN4 und der Fähigkeit, die MgCh zu stimulieren, herzustellen (Abbildung 4.6). Aus den veröffentlichten Datensätzen können drei Gruppen von Aminosäuremutationen im GUN4 isoliert werden. 1. Punktmutationen, die keine veränderte Stimulation der MgCh hervorrufen aber zu veränderter Porphyrinbindung an GUN4 führen. 2. Punktmutationen, die einen Einfluss auf die Stimulation der MgCh-Reaktion *und* die Porphyrinbindung haben. 3. Mutationen von Aminosäuren, die zu einer veränderten MgCh-Stimulation, nicht aber zur Beeinflussung der Porphyrinbindung von GUN4 führen (Abbildung 4.6). Mit Hinblick auf die kontroverse Debatte über die Notwendigkeit der Porphyrinbindung für die Stimulation der MgCh durch GUN4 (siehe Abschnitt 4.1.3, S.263), ist lediglich die dritte Gruppe von Mutationen geeignet einen Hinweis auf die für die Stimulation der MgCh wichtigen Aminosäuren zu erhalten. Zeitgleich belegt die unveränderte Porphyrinbindung an diesen mutierten Proteinen deren strukturelle Integrität und korrekte Faltung. Sechs von acht Aminosäuren dieser Gruppe befinden sich auf der von der Porphyrinbindungstasche abgewandten Seite des GUN4 (Abbildung 4.6 B). Die Seitengruppen der sechs Aminosäuren sind zur Oberfläche des Proteins ausgerichtet und offensichtlich nicht strukturgebend. Daher konnte spekuliert werden, dass die Mutation dieser Aminosäuren zu einer Veränderung der Interaktion mit der MgCh führt (möglicherweise H Untereinheit). Unterstützt wird diese Annahme durch den Befund, dass Arginin (R), Aspartat (D) und Prolin (P) innerhalb von Protein-Protein-Interaktionsflächen überrepräsentiert sind (Ofra und Rost, 2007).

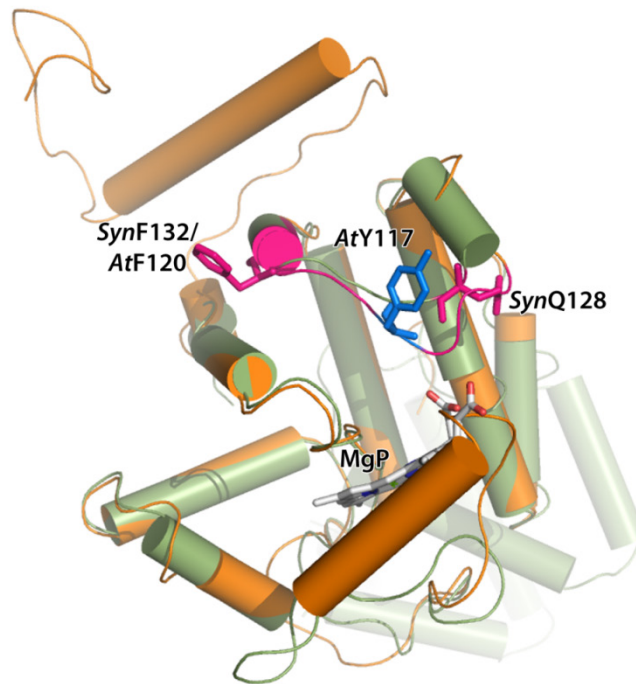




**Abbildung 4.6: Einfluss von Punktmutationen im *Synechocystis* (Syn)GUN4-Protein auf die Stimulationsfähigkeit der *in vitro* MgCh-Aktivität.**

(A) Die Daten zur Stimulation der *in vitro* MgCh-Aktivität durch die rekombinanten GUN4-Proteine wurden aus Davison et al. (2005); Verdecia et al. (2005); Kopečna et al. (2015) entnommen, das Verhältnis zur GUN4(WT)-Kontrolle errechnet und als  $\log_2$ -Wert gegen die Aminosäureposition aufgetragen. Die farbig markierten Datenpunkte (pink) entsprechen dabei Mutationen, die einen Einfluss auf die Stimulation der MgCh-Aktivität, nicht aber auf die Porphyrinbindung (Veränderung der Affinität zu den Porphyrinen ( $\Delta K_d$ ) relativ zum GUN4(WT) in den Grenzen von  $0,5 > \Delta K_d < 2$ ). (B) Experimentell ermittelte Kristallstruktur des SynGUN4 (Datenbankeintrag 4XKC / Chen et al. (2015b)) mit Hervorhebung (Pink) der Aminosäuren, die einen Einfluss auf die Stimulationsfähigkeit der MgCh-Aktivität haben (siehe A). In Grau ist das MgP gezeigt.

Im Zusammenhang mit der möglichen Modifikation von *Arabidopsis* GUN4 am Y117 zeigte sich, dass der Bereich des *Synechocystis* GUN4 zwischen Q128 und F132 möglicherweise eine besondere Funktion für die Interaktion mit der MgCh hat. Das SynF132/AtF120 ist in den untersuchten GUN4-Homologen konserviert (Abbildung 3.68) und der Austausch im SynGUN4 führt zu einer Abnahme der MgCh-Stimulation. Ferner zeigt die strukturelle Analyse, dass das in den Angiospermen konservierte AtY117 (Abbildung 3.68) im selben Bereich wie auch SynQ128 und SynF132 zu finden ist (Abbildung 4.7). Dieser GUN4-Abschnitt scheint wichtig für die Stimulation der MgCh zu sein. Neben den zuvor genannten Aminosäuren ist auch Tyrosin innerhalb von Protein-Protein-Interaktionsflächen überrepräsentiert (Ofra und Rost, 2007). Zusammen mit der verminderten Stimulation der MgCh, wenn modifiziertes GUN4 vorliegt (Bande C), könnte daher vermutet werden, dass das AtY117 zur Interaktion mit der MgCh beiträgt. Als Folge der Modifikation dieses Tyrosins würde die Interaktion zwischen GUN4 und MgCh-Untereinheiten negativ beeinflusst, bzw. eingeschränkt werden.



**Abbildung 4.7: Lokalisierung des *Arabidopsis* (At)Y117 in einer Überlagerung der Strukturen von *Synechocystis* (Syn) und AtGUN4.**

Die experimentell ermittelte Kristallstruktur des SynGUN4 (Datenbankeintrag 4XKC / Chen et al. (2015b)) wurde mit einer vorhergesagten Struktur des AtGUN4 überlagert. Das SynF132/AtF120 und das SynQ128 sind hervorgehoben (Pink). Beide Aminosäuren sind für die Stimulation der MgCh-Aktivität von Bedeutung (siehe Abbildung 4.6). Ebenfalls hervorgehoben ist das At Peptid (pinke Schleife zwischen Q128 und F132), welches das möglicherweise modifizierte AtY117 (Blau) beherbergt. In Grau ist das MgP gezeigt.

Wenngleich die Kombination von biochemischen Ergebnissen mit strukturellen Informationen einen Zusammenhang zwischen der zusätzlichen Modifikation und Funktion von GUN4 nahelegen, sollte dieser im Rahmen von weiteren Experimenten eingehender analysiert werden. Neben Arbeiten mit rekombinanten GUN4-Proteinen könnte die Komplementation einer *knockout* Mutante von *GUN4* (*gun4-2*) mit dem GUN4(Y117) mit *GUN4*(Y117S/F) maßgeblich zur Aufklärung der Funktion dieser Aminosäure beitragen. Zum einen könnten die Bedingungen, in denen die Modifikation des GUN4 auftritt mit dem Einfluss auf die MgCh in einem physiologischen Kontext korreliert werden. Zum anderen sollte die Erzeugung und Untersuchung von weiteren GUN4-Punktmutanten zur Identifizierung der für die Interaktion mit der MgCh notwendigen Aminosäuren und Strukturen des GUN4 dienen. Grundlage hierfür könnte die vorhergehende Analyse sein (siehe oben). Ist die zugrunde liegende Modifikation erst einmal identifiziert und das verantwortliche Enzym isoliert, kann mit der Hilfe von *in vitro* Experimenten der Versuch unternommen werden, den Einfluss der zusätzlichen Modifikation auf die Bindungsparameter gegenüber Untereinheiten der MgCh zu untersuchen.

Zusätzlich zur immunoreaktiven Bande C kann das AtGUN4 auch in einer höhermolekularen Bande A in einem Pflanzenextrakt detektiert werden (Abbildung 3.63). Die Hintergründe und der

physiologische Einfluss dieser weiteren Modifikation am GUN4 bleiben zunächst ungeklärt. Analog zur Untersuchung der Bande C, sollte der Versuch unternommen werden, die durch die Bande A repräsentierte GUN4-Spezies anzureichern und mittels Massenspektrometrie zu analysieren.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es mit dieser Arbeit gelungen ist das regulatorische Netzwerk der TBS um eine zusätzliche post-translationale Modifikation von GUN4 zu erweitern. Zukünftige Analysen werden dazu beitragen können, die physiologische Signifikanz dieser Modifikation für die Funktion von GUN4 und die Regulation der MgCh aufzuklären.



## 4.4 Einfluss der Phenylpropanoidbiosynthese auf die GUN-vermittelte retrograde Kommunikation

Neben den Analysen zur Phosphorylierung von GUN4 wurde mit dieser Arbeit der Versuch unternommen, Hinweise auf das durch die GUN-Proteine vermittelte retrograde Signal zu erhalten. Wenngleich keine zusätzlichen Informationen zum gemeinsamen (plastidären) Signal der *gun* Mutanten gewonnen wurden, wurden erste Indizien für eine weitere Komponente der durch die GUN-Proteine vermittelten retrograden Kommunikation identifiziert. Wie sich zeigte, beeinflusst ein Intermediat der cytosolischen Phenylpropanoidbiosynthese das sogenannte *biogenic signaling* (siehe Abschnitt 1.8.2, S.62). Um diese neuen Befunde in den Kontext der *gun* Mutanten setzen zu können, sollen im folgenden Abschnitt zunächst die bereits publizierten Informationen zu den *gun* Mutanten rekapituliert werden.

### 4.4.1 Gemeinsamkeiten und Unterschiede bekannter *gun* Mutanten

Fünf der bis heute publizierten GUN-Proteine sind direkt an den enzymatischen Reaktionen der TBS beteiligt. In den *gun2* und *gun3* sind die HÄMOXYGENASE beziehungsweise die PHYTOCHROMOBILLIN SYNTHASE mutiert (Davis et al., 1999; Muramoto et al., 1999; Vinti et al., 2000; Kohchi et al., 2001). Eine weitere den Hämsyntheseweg betreffende *gun* Mutante ist eine Überexpressionslinie der FC1 (*gun6*, Woodson et al. (2011)). Die zwei verbleibenden Mutanten kodieren für eine mutierte H Untereinheit der MgCh (*gun5*) und ein punktmutiertes GUN4 (*gun4*) (Mochizuki et al., 2001; Larkin et al., 2003). Auch für die D und I Untereinheit der MgCh konnte eine Einflussnahme auf die retrograde Kommunikation nachgewiesen werden (Gadjieva et al., 2005; Huang und Li, 2009). Im Gegensatz zu *gun2*, *gun3* und *gun6* betreffen die Mutationen der MgCh Komponenten in *gun4* und *gun5* den Chl-Synthesezweig. Die Identifizierung von fünf *gun* Mutanten mit Defekten innerhalb der TBS führte zur Definition eines TBS-spezifischen Signals des *biogenic signaling* mit (zunächst) unbekannter Identität (siehe Einleitung Abschnitt 1.8.2, S.62). Interessanterweise zeigen weitere Mutanten der TBS keinen molekularen *gun* Phänotyp (Abbildung 3.72 und Voigt et al. (2010); Woodson et al. (2011)). Diese Tatsache ist ein Beleg für ein spezifisches retrogrades Signal ausgehend vom Verzweigungspunkt der TBS.

Mit GUN1 wurde hingegen ein Protein identifiziert, welches die retrograde Kommunikation in Verbindung mit der organellären Genexpression (OGE) bringt (Susek et al., 1993; Koussevitzky et al., 2007; Cottage et al., 2010; Colombo et al., 2016). Eine *gun1* Mutante weist eine Beeinflussung der Ergrünung nach verlängerten Phasen der Etiolierung auf (Susek et al., 1993; Vinti et al., 2000). Zusätzlich zu den Komponenten der OGE interagiert GUN1 mit der FC1 und der D Untereinheit der MgCh (Tadini et al., 2016). Trotz dieser Befunde ist eine unter Standardbedingungen angezogene

*gun1* nicht vom WT zu unterscheiden. Folglich hat GUN1 keinen direkten Einfluss auf die Reaktionen der TBS. Das Fehlen von GUN1 wird unter normalen Anzuchtsbedingungen toleriert.

Die OGE und TBS erscheinen zunächst als zwei unabhängige Prozesse. Dennoch existiert ein Zusammenhang zwischen dem von der OGE und TBS ausgehenden Signal. Zum einen kann die Entkopplung von *PHANGs* in der *gun1* Mutante sowohl durch einen OGE-spezifischen Hemmstoff (z.B. Lincomycin) als auch durch NF (TBS-spezifisch) hervorgerufen werden (Susek et al., 1993; Koussevitzky et al., 2007). Zum anderen sind die Transkriptionsprofile von NF-behandelten *gun1* und *gun5* Mutanten nahezu identisch. In beiden Genotypen führt die Mutation der entsprechenden plastidären Proteine zur Entkopplung von im Zellkern kodierten *PHANGs*. Zusätzlich zeigt eine *gun1/gun5* Doppelmutante dieselbe Stärke der Expression von *PHANGs* wie die Einzelmутanten nach NF-Behandlung (Koussevitzky et al., 2007). Daher wurde angenommen, dass GUN1 (OGE-spezifisch) und GUN5 (TBS-spezifisch) Signale unterschiedlichen Ursprungs erzeugen, die jedoch denselben retrograden Signalweg beeinflussen.

Über das (gemeinsame) Signal, welches die De-regulation der *PHANGs* in *gun1* und den *gun* Mutanten innerhalb der TBS bewirkt, ist bisher wenig bekannt. Da die Funktion(en) von GUN1 noch nicht aufgeklärt wurde(n), kann zum Ursprung des Signales der OGE-abhängigen Kommunikation keine Aussage getroffen werden. Bisher ist lediglich die Quelle des TBS-abhängigen Signales in Ansätzen verstanden. Im Verlauf der vergangenen Jahre wurden zwei Konzepte für einen TBS-spezifischen Signalweg präsentiert. Das erste Konzept ging dabei von einem negativen Signal aus, das die *PHANG*-Expression als Folge einer eingeschränkten Chloroplastenentwicklung reprimiert (Mochizuki et al., 2001; Strand et al., 2003; Strand, 2004; Beinfeld et al., 2006; Woodson und Chory, 2008). Es wurde postuliert, dass MgP, das Produkt der MgCh, in NF-behandelten WT-Pflanzen akkumulieren soll. Die Akkumulation von MgP soll sodann die Repression der *PHANGs* vermitteln. Da die *gun2-5* Mutanten durch eine eingeschränkte TBS-aktivität (reduzierte ALA-Synthese, Porphyrin- und Chlorophyllgehalt; Abbildung 4.8) charakterisiert sind, soll MgP nicht akkumulieren. Daher soll das reprimierende Signal nicht von *gun* Chloroplasten ausgesendet werden und die Expression der *PHANGs* im Vergleich zum WT weiterhin erhöht sein. Obwohl die präsentierten Daten in sich schlüssig schienen, musste dieses Konzept revidiert werden. Zum einen wurde gezeigt, dass NF-behandelte WT-Pflanzen kein MgP akkumulieren und die Expression von *PHANGs* nicht mit dem Gehalt von MgP korreliert (Mochizuki et al., 2008; Moulin et al., 2008). Zum anderen zeigen weitere Mutanten der TBS keine Entkopplung der *PHANG*-Expression nach NF-Behandlung (Abbildung 4.8 und Voigt et al. (2010); Woodson et al. (2011)). Trotzdem *chl<sub>m</sub>* und *cao* Mutanten eine reduzierte ALA-Synthese, Porphyrin- und Chlorophyllgehalte aufweisen, zeigen diese Mutanten keinen *gun* Phänotyp (Abbildung 4.8).

	ALA-Synthese	Porphyringehalte	Chlorophyll	Häm	PHANGs @ NF
WT					
<i>gun1</i>	?	?	?		
<i>gun2 (hy1)</i>			?		
<i>gun3 (hy2)</i>			?		
<i>gun4-1</i>					
<i>gun4-3</i>					
<i>gun5</i>					
<i>gun6</i>	?		?		
<i>chlm</i>			?		
<i>cao</i>			?		
<i>cpsrp43/54</i>			?		

**Abbildung 4.8: Übersicht zu den bisher bekannten Parametern von *gun* und nicht-*gun* Mutanten.**

Die Tabelle zeigt die bisher bestimmten Parameter in den Mutanten relativ zum WT. Mit Ausnahme der *PHANG*-Expression, beziehen sich die Angaben auf die Anzucht der Genotypen unter Standardbedingungen. Die Expression der *PHANGs*, ist relativ zum unbehandelten WT angegeben. Die Verminderung eines Parameters ist in Rot, die Erhöhung eines Messwertes in Grün dargestellt. *gun6* soll erhöhte Häm-Gehalte aufweisen (Hellgrün). Felder in Grau entsprechen einem WT-artigen Gehalt. Veränderungen für die bisher keine experimentellen Daten vorliegen, sind mit einem Fragezeichen versehen. Die Daten wurden aus publizierten Arbeiten entnommen (Susek et al., 1993; Davis et al., 1999; Vinti et al., 2000; Kohchi et al., 2001; Mochizuki et al., 2001; Larkin et al., 2003; Koussevitzky et al., 2007; Pontier et al., 2007; Peter und Grimm, 2009; Cottage et al., 2010; Voigt et al., 2010; Woodson et al., 2011). Ergänzt wird diese Übersicht durch bisher nicht veröffentlichte Analysen dieser Arbeit (A. Richter, P. Wang, B. Grimm, nicht veröffentlicht).

Das zweite Konzept zum TBS-spezifischen Signalweg basiert auf den Untersuchungen einer FC1-Überexpressionslinie (*gun6*). Das durch die FC1 synthetisierte Häm soll als positives Signal Auskunft über den Zustand der Chloroplasten geben (Woodson et al., 2011). Während der Häm-Gehalt in NF-behandelten WT-Pflanzen reduziert ist, soll dieser in der *gun6* erhöht sein und zur Induktion der *PHANG*-Expression führen. Es könnte angenommen werden, dass auch die *gun2* und *gun3* Mutanten mit einem Defekt im Häm-Katabolismus Häm akkumulieren. Ferner könnte die reduzierte MgCh-Aktivität in *gun4* und *gun5* Mutanten durch die Umverteilung von ProtoIX in den Häm-Zweig zu einer Erhöhung des Häm-Gehaltes führen. Wenngleich das Konzept des positiv wirkenden Häms die beobachteten Effekte in den *gun2-5* Mutanten bisher am besten erklärt, gibt es eine wesentliche Limitation. Weder für die *gun6* selbst, noch für die *gun2-5* konnte ein erhöhter Häm-Gehalt nach NF-Behandlung gezeigt werden (Voigt et al., 2010; Woodson et al., 2011).

Neben dem Ursprung eines Signales existieren drei weitere Ebenen innerhalb eines Signalweges. Das ausgesendete Signal muss 1. wahrgenommen und 2. an nachfolgende Komponenten weitergeleitet werden. Das kommunizierte Signal muss 3. abschließend in eine Antwort übersetzt werden. Für den GUN1-abhängigen Signalweg konnte gezeigt werden, dass ein mobiler Transkriptionsfaktor (PTM) in die Vermittlung des OGE-spezifischen Signales involviert ist (Sun et al., 2011). In Abhängigkeit des

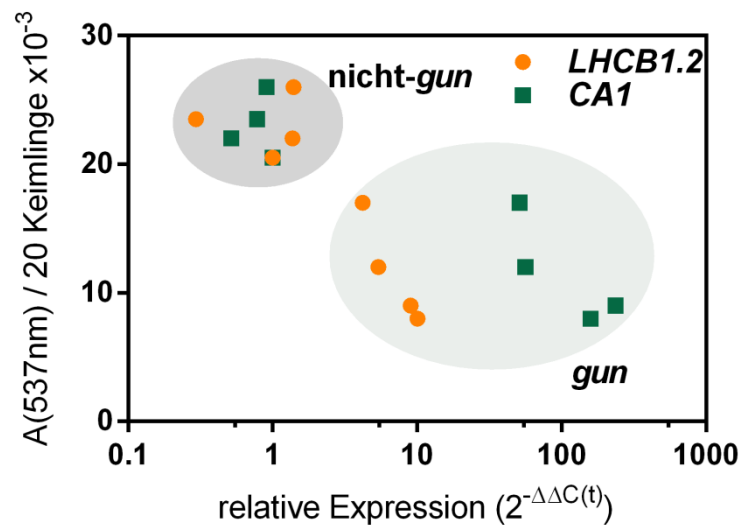
Zustandes der Chloroplasten verändert dieser seine sub-zelluläre Lokalisation. Wird der GUN1-abhängige Signalweg induziert, verlagert sich PTM von der Hüllmembran des Chloroplasten in den Zellkern und induziert dort die Expression von ABI4 (Sun et al., 2011). Der Transkriptionsfaktor ABI4 wurde als negativ Regulator der GUN1-abhängigen *PHANG*-Expression identifiziert (Koussevitzky et al., 2007). Folglich führt die Stimulation der ABI4-Expression durch PTM zur Repression der *PHANG*s. Für die OGE-abhängige Kommunikation wurden somit die theoretisch notwendigen Komponenten einer Signalkaskade identifiziert: das plastidäre Signal (GUN1-abhängig) wird durch einen im Cytosol mobilen Transkriptionsfaktor (PTM) in eine transkriptionelle Antwort im Zellkern übersetzt (ABI4-abhängige Repression der *PHANG*s). Obwohl die OGE- und TBS-abhängigen Signale dieselben Gene regulieren (z.B. Koussevitzky et al. (2007)), wurde bisher nicht gezeigt, dass PTM/ABI4 an der Vermittlung des TBS-spezifischen Signales beteiligt sind. Im Falle der TBS-spezifischen Kommunikation ist bisher tatsächlich nicht geklärt, wie das Signal die Kontrolle der nukleären Genexpression ermöglicht. Mit anderen Worten: Es fehlt ein experimenteller Hinweis auf Komponenten, die zwischen den Chloroplasten als Ort der Entstehung des TBS-Signals und der nukleären Genexpression vermitteln. Existieren zwei retrograde Signalwege, die die Kontrolle der *PHANG*-Expression ermöglichen? Ist die durch GUN1-PTM-ABI4 vermittelte Kommunikation vollständig unabhängig vom TBS-Signal? Oder werden die Signale des OGE und der TBS an einer bisher unbekannten Komponente integriert und in eine gemeinsame Antwort übersetzt? Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente zur retrograden Kommunikation deuten auf eine gemeinsame Schnittmenge des OGE- und TBS-abhängigen Signalweges (Abschnitt 3.12, S.237).

#### **4.4.2 Zusammenhang zwischen Anthocyanakkumulation und De-repression der *PHANG*s in *gun* Mutanten**

Der erste Hinweis für die zuvor angedeutete gemeinsame Komponente der GUN-vermittelten retrograden Kommunikation wurde aus der phänotypischen Analyse von *gun* Mutanten nach NF-Behandlung gewonnen. Im Vergleich zu WT-Pflanzen und nicht-*gun* Mutanten (z.B. *chl*m, *cao*) zeigten die *gun* Mutanten eine deutlich verminderte Färbung der Kotyledonen nach NF-Behandlung (Abbildung 3.72). Diese Färbung wurde auf die Akkumulation von Anthocyanen zurückgeführt. Stellt man die Anthocyanakkumulation der *PHANG*-Expression nach NF-Behandlung gegenüber, ergibt sich eine eindeutige Korrelation zwischen beiden Parametern (Abbildung 4.9 und Abbildung 3.72). Je stärker die Akkumulation von Anthocyanen war, desto geringer fiel die Expression der *PHANG*s aus. Genotypen, die eine WT-artige Akkumulation von Anthocyanen zeigten, reprimierten die Expression von *CA1* und *LHCB1.2* (Abbildung 4.9, nicht-*gun*). Im Gegensatz dazu akkumulierten die *gun1*, *gun4* und *gun5* Mutanten weniger Anthocyane als der WT und reprimierten die nukleäre Expression von *PHANG*s nicht im Vergleich zum WT (Abbildung 4.9, *gun*). Auch eine FC1-Überexpressionslinie (*gun6*)



und die zur *gun2* beziehungsweise *gun3* allelischen Mutanten *hy1* und *hy2* zeigten eine verminderte Anreicherung von Anthocyanen nach NF-Behandlung (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 4.9: Korrelation zwischen Anthocyanakkumulation (A537) und relativer Expression von PHANGs (CA1 und LHCb1.2) nach NF-Behandlung.**

Die Daten wurden der (Abbildung 3.72) entnommen. Zwischen der Akkumulation von Anthocyanen und der Expression von PHANGs nach NF-Behandlung besteht eine negative mathematische Korrelation (Pearson Korrelationskoeffizient:  $r(\text{Anthocyane vs LHCb1.2}) = -0,874$ ;  $p < 0,003$  /  $r(\text{Anthocyane vs CA1}) = -0,947$ ;  $p < 0,0002$ ).

Interessanterweise wurde der makroskopische Unterschied in der Anreicherung von Anthocyanen zwischen *gun* und nicht-*gun* Mutanten bereits zuvor beobachtet (Cottage et al., 2010; Voigt et al., 2010). Im Falle der durch Cottage et al. (2010) untersuchten *gun1* Mutante war der Zusammenhang offensichtlich. Sowohl unter dem Einfluss von NF, als auch Lincomycin (OGE-spezifischer Hemmstoff) akkumulierte die *gun1* Mutante weniger Anthocyane als der WT. Die Bewertung der Ergebnisse von Voigt et al. (2010) ist hingegen schwieriger. Auch in dieser Publikation akkumulieren die *gun1*, *gun2*, *gun4* und *gun5* Mutanten weniger Anthocyane nach NF-Behandlung als der WT. Zusätzlich zu NF wurden die Genotypen mit zwei weiteren Hemmstoffen der Carotinoidbiosynthese behandelt. Wie auch unter NF, führte die Hemmung der PHYTOEN DESATURASE durch Flurochloridon zu verminderten Anthocyangehalten in *gun* Mutanten. Die Anwendung von Amitrol (Hemmstoff der LYCOPEN CYCLASE) hingegen führte zu keinem makroskopisch sichtbaren Unterschied zwischen dem WT und *gun* Mutanten (Voigt et al., 2010). Die Anwendung der genannten Hemmstoffe hatte eine erhöhte *LHCb1.2*-Expression in den *gun* Mutanten zur Folge. Daher ist es nachvollziehbar, dass Voigt et al. (2010) einen Zusammenhang zwischen dem GUN-vermittelten Signal und Anthocyanakkumulation ausgeschlossen haben. An dieser Stelle muss jedoch festgehalten werden, dass Voigt et al. (2010) keine Quantifizierung der Anthocyane vorgenommen haben. Daher wäre es denkbar, dass die *gun* Mutanten auch nach Amitrol-Behandlung weniger Anthocyane als der WT akkumulierten.

Wie sich zeigte, ist die reduzierte Anthocyanakkumulation eine direkte Folge der verminderten Expression von Enzymen der cytosolischen Flavonoidbiosynthese in den *gun* Mutanten (Abbildung 3.74 und Abbildung 3.75). Sowohl die Expression von *early biosynthesis genes* (EBGs) und *late biosynthesis genes* (LBGs) der Flavonoidbiosynthese (siehe Einleitung Abschnitt 1.9.2, S.72) war in den *gun* Mutanten vermindert. Genotypen die keinen *gun* Phänotyp und einen WT-artigen Anthocyangehalt aufwiesen (Abbildung 3.72), zeigten eine mindestens WT-artige Expression der EBGs und LBGs (Abbildung 3.74 und Abbildung 3.75). Diese Ergebnisse sind in Einklang mit zuvor publizierten Studien. Sowohl in *gun1* als auch *gun5* Mutanten wurden reduzierte Expressionswerte von EBGs und LBGs der Flavonoidbiosynthese beobachtet (Koussevitzky et al., 2007; Cottage et al., 2010). Die reduzierte Expression der Flavonoidbiosynthesegene wird dabei durch eine verminderte Expression von stimulierenden Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel PAP1, TTG1, TT8 und PFG1 bedingt (Abbildung 3.72 und Abbildung 3.73). Während die Expression dieser Transkriptionsfaktoren im WT unter NF-Behandlung induziert wird, bleibt die Stimulation der Flavonoidbiosynthese in einer *gun5* Mutante aus (Abbildung 3.75). Als Komponenten eines regulatorischen MYB-bHLH-WD40 (MBW)-Komplexes (Xu et al., 2015; Passeri et al., 2016), sind die untersuchten Transkriptionsfaktoren für die Induktion von Flavonoidbiosynthesegenen und damit auch für die Bildung von (u.a.) Anthocyanen verantwortlich (Zhang et al., 2003; Tohge et al., 2005; Stracke et al., 2007).

Aufgrund der genotypischen Diversität der bisher analysierten *gun* Mutanten kann eine sekundäre Mutation als Ursache für die beeinträchtigte Flavonoidbiosynthese in diesen Mutanten nahezu ausgeschlossen werden. So zeigen beispielsweise die Punktmutante für *GUN4* (*gun4-1*, Larkin et al. (2003)) als auch die T-DNA-Insertionsmutante (*gun4-3*, Peter und Grimm (2009)) die gleiche Beeinträchtigung der Flavonoidbiosynthese (Abbildung 3.72).

Die durch die GUN-Proteine vermittelte retrograde Kommunikation soll nur während der Chloroplastenbiogenese eine Rolle spielen. Der als *biogenic signaling* bezeichnete retrograde Signalweg ist durch seinen zeitlich begrenzten Einfluss während der Plastidenentwicklung, den Ursprung des Signales und der induzierten transkriptionellen Antwort von den Signalwegen des *operational signaling* abzugrenzen (Pogson et al., 2008; Chan et al., 2015). Ist die Chloroplastenentwicklung vollzogen, gewährleisten die Komponenten des *operational signaling* die Aufrechterhaltung der zellulären Integrität unter Stressbedingungen (Abschnitt 1.8.1, S.59). Die Akkumulation von Endprodukten der Flavonoidbiosynthese (z.B. Anthocyane) wird als Strategie zur Vermeidung von biotischem und abiotischem Stress angesehen (Zhao und Tao, 2015; Comisso et al., 2016). Interessanterweise zeigten adulte *gun4* und *gun5* Mutanten auch unter Kältestress (Abbildung 3.27, Kindgren et al. (2015)) und Hochlichtbedingungen (A. Richter und B. Grimm, nicht veröffentlicht) eine verminderte Akkumulation von Anthocyanen. Wenngleich bisher nur teilweise

experimentell verifiziert, kann von einer reduzierten Aktivität der Flavonoidbiosynthese in den *gun* Mutanten unter einer Vielzahl abiotischen Stressbedingungen ausgegangen werden. Ob und inwiefern es eine Korrelation zwischen *PHANG*-Expression und Beeinträchtigung der Flavonoidbiosynthese in *gun* Mutanten auch unter Bedingungen des *operational signaling* gibt, bleibt zunächst offen. Die vergleichende Analyse von Transkriptionsprofilen von *gun* und nicht-*gun* Mutanten, angezogen unter Kälte- oder Starklichtstress, werden helfen eine mögliche Verbindung zwischen *biogenic* und *operational signaling* herzustellen.

Mit Bezug auf die Frage nach einem gemeinsamen Merkmal der *gun* Mutanten, kann in der Zusammenfassung festgehalten werden, dass die analysierten *gun* Mutanten durch eine Einschränkung in der Flavonoidbiosynthese charakterisiert sind. Diese Einschränkung wird durch eine verminderte Expression von Flavonoidbiosynthesegenen bedingt und wirkt sich auf die Akkumulation von Endprodukten der Flavonoidbiosynthese während der Plastidenentwicklung und unter abiotischem Stress aus. *gun* Mutanten sind folglich (sekundäre) *knockdown* Mutanten des cytosolischen Flavonoidbiosyntheseweges. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass ein funktioneller Plastid für die Induktion der Flavonoidbiosynthese notwendig ist. Mit anderen Worten könnte ein GUN-vermitteltes retrogrades Signal für die Kontrolle der cytosolischen Flavonoidbiosynthese notwendig sein.

#### 4.4.3 Die Phenylpropanoidbiosynthese: ein Regulator nukleärer Transkription?

Basierend auf der zuvor beschriebenen Korrelation wurde zeitgleich spekuliert, dass Anthocyane selbst einen Einfluss auf die Expression von *PHANGs* ausüben können. Es wäre denkbar gewesen, dass akkumulierende Endprodukte der Flavonoidbiosynthese (z.B. Anthocyane) einen reprimierenden Einfluss auf die *PHANG*-Expression ausüben können, wenn die Plastidenentwicklung inhibiert ist. Mit der Analyse von anthocyandefizienten Mutanten (*tt* Mutanten, Abbildung 3.76), wurde diese Hypothese jedoch nicht bestätigt. Mit Ausnahme der *tt4* und *ttg1* zeigten alle weiteren *tt* Mutanten eine WT-artige Expression von *CA1* und *LHCB1.2* nach NF-Behandlung (Abbildung 3.77). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass Anthocyane *per se* einen Einfluss auf die Expression von *PHANGs* nach NF-Behandlung haben. Lediglich der *knockout* der im Cytosol lokalisierten CHALCON SYNTHASE (CHS) in der *tt4* Mutante führt zur Entkopplung der *PHANG*-Expression vom Plastidenzustand nach NF-Behandlung. Dies ist eigentlich ein Alleinstellungsmerkmal für die plastidären *gun* Mutanten. Die Identifizierung der *tt4* Mutante als *gun* Mutante deutet daher auf eine neue cytosolische Komponente der GUN-vermittelten retrograden Kommunikation (Abbildung 4.10).

Da angenommen wurde, dass das *CHS*-Transkript selbst keinen Einfluss auf die Kerngenexpression nimmt, konnte spekuliert werden, dass eine akkumulierende Vorstufe der CHS-Reaktion in der *tt4* Mutante den retrograden Signalweg beeinflusst. Die CHS katalysiert die Umwandlung von p-Coumaroyl CoA zu Tetrahydroxychalcon und wird als ratenlimitierendes Enzym der Flavonoidbiosynthese angesehen (Saito et al., 2013). Das Substrat der CHS geht als letztes Intermediat aus der Phenylpropanoid-biosynthese hervor. Die Umwandlung von p-Coumarinsäure zu p-Coumaroyl CoA wird durch vier 4-COUMARATE:COA LIGASEN (4CLs) katalysiert (Abschnitt 1.9.1, S.70). Folglich sollte die Hemmung der CHS durch Apigenin oder Luteolin zur Akkumulation von p-Coumaroyl CoA und die Hemmung der 4CLs zur Akkumulation von p-Coumarinsäure führen (Abbildung 4.10). Wenngleich der Grad der Hemmung der CHS durch Apigenin oder Luteolin zu hinterfragen war (Abbildung 3.79), führte die vermeintliche Akkumulation des CHS-Substrates nicht zu einer erhöhten *PHANG*-Expression nach NF-Behandlung von WT-Pflanzen. Im Gegensatz dazu entkoppelte die Hemmung der 4CLs durch MDCA die Kerngenexpression vom Zustand der Plastiden in NF-behandelten WT-Pflanzen. Auch ein Überangebot von p-Coumarinsäure, die Vorstufe der 4CLs, verhindert die Repression von *CA1* unter dem Einfluss von NF (Abbildung 3.80). Somit konnte der molekulare *gun* Phänotyp in WT-Pflanzen simuliert werden. Dies ist ein Beweis dafür, dass ein Phenylpropanoid die Kerngenexpression im WT bei gestörter Plastidenentwicklung steuern kann. Es wird angenommen, dass sich p-Coumarinsäure positiv auf die Expression von *PHANGs* auswirkt. Relativierend muss hinzugefügt werden, dass die Hemmung der 4CLs auch zur Akkumulation von Zimtsäure, dem Vorläufermolekül von p-Coumarinsäure, führen und die Expression der *PHANGs* beeinflussen könnte. Dem steht jedoch gegenüber, dass der *knockout* der *4CL1/2* nur die Akkumulation von p-Coumarinsäure bewirkt (Vanholme et al., 2012). Ferner hat ein Überangebot von Zimtsäure keine erhöhte *CA1*-Expression nach NF-Behandlung von WT-Pflanzen zur Folge (Abbildung 3.80). Auch die deutliche Hemmung der CINNAMIC ACID 4-HYDROXYLASE (C4H) durch PIP (Abbildung 3.79) und eine daraus vermeintlich resultierende Akkumulation von Zimtsäure beeinflusst die Kerngenexpression nicht (Abbildung 3.80). Aus einer Analyse des Transkriptprofils von *4cl1* und *4cl2* Mutanten lässt sich ein weiterer spannender Befund ableiten. Diese Mutanten sind bereits unter Standardanzuchtbedingungen durch eine signifikant erhöhte Expression von *CA1* und Vertretern der *LHC*-Familie charakterisiert (Vanholme et al., 2012). Im Vergleich dazu sind dieselben Transkripte in Mutanten von zwei PHENYLALANINE AMMONIA LYASEN (*PAL1* und *2*) reduziert (Vanholme et al., 2012). Mit der Umwandlung von Phenylalanin zu Zimtsäure leiten die *PAL* den Phenylpropanoidbiosyntheseweg ein (Abbildung 4.10). Folglich führt der eingeschränkte Fluss von Intermediaten in *pal1* und *pal2* zu einer reduzierten Expression von *PHANGs*. Da Phenylalanin als Substrat für alle Phenylpropanoide und Flavonoide seinen Ursprung in den Plastiden hat, ist somit



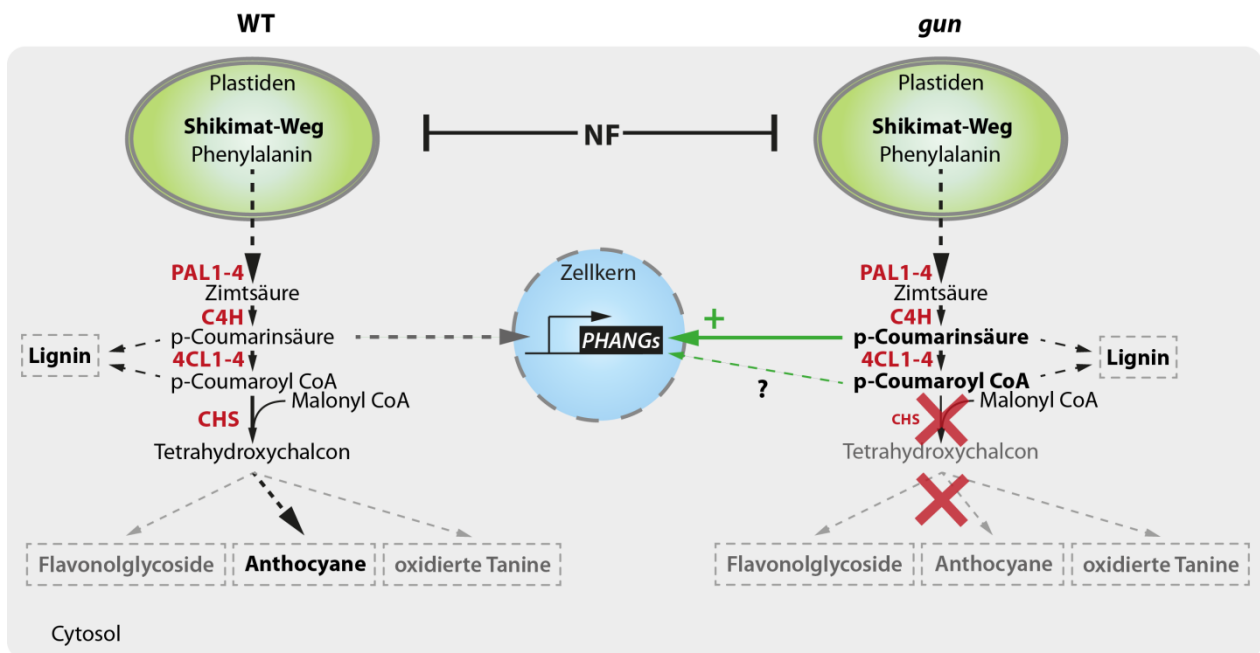
Um den Einfluss der Intermediate des Phenylpropanoidbiosyntheseweges auf die Kerngenexpression eingehender zu studieren, sollten weitere Mutanten dieses Stoffwechselweges mit Blick auf die retrograde Kommunikation analysiert werden. Hierfür könnten (Doppel-)Mutanten der *PALs*, *C4H*, *4CLs* und *CHS* mit und ohne NF angezogen werden. Wenngleich die Indizien für p-Coumarinsäure sprechen, werden Transkriptions- und Metabolitprofile sodann von Nutzen sein, das spezifische Intermediat zu identifizieren, welches die Kontrolle der *PHANG*-Expression ermöglicht.

#### **4.4.4 Ist ein Intermediat der Phenylpropanoidbiosynthese ein Vermittler des retrograden Signals in *gun* Mutanten?**

Wie lassen sich der Einfluss der cytosolischen Phenylpropanoidbiosynthese auf die Kerngenexpression und der molekulare Phänotyp aller *gun* Mutanten nach NF-Behandlung in Einklang bringen? Gibt es eine Verbindung zwischen phenylpropanoidabhängiger und GUN-vermittelter *PHANG*-Expression? Oder, ist der neu identifizierte Weg zur Kontrolle der Kerngenexpression unabhängig vom GUN-vermittelten retrograden Signal der Plastiden?

Die Gene der Phenylpropanoidbiosynthese (*PALs*, *C4H*, *4CLs*) werden auf WT-artigem Niveau in *gun1* und *gun5* Mutanten exprimiert, sodass in diesem Syntheseweg keine Beeinträchtigung vorliegt (Abbildung 3.73 und Koussevitzky et al. (2007)). Im Gegensatz dazu sind die *gun* Mutanten nicht in der Lage die Gene der nachgeschalteten Flavonoidbiosynthese nach NF-Behandlung zu induzieren (siehe Abschnitt 4.4.2, S.292). Das Transkript des ersten Enzyms der Flavonoidbiosynthese, die *CHS*, konnte in allen analysierten *gun* Mutanten nur zu 50-60% des WT-Gehaltes detektiert werden. Für weitere EBGs und LBGs der Flavonoidbiosynthese wurde eine ähnliche, oder sogar drastischere Reduktion im Vergleich zum WT beobachtet (Abbildung 3.72). Die Reduktion des *CHS* Transkriptes klassifiziert die *gun* Mutanten daher als *knockdown* Mutanten u.a. für die *CHS*. Analog zu den Ausführungen zur *tt4* Mutante, könnte davon ausgegangen werden, dass sich auch in den *gun* Mutanten ein Intermediat der Phenylpropanoid-biosynthese anreichert (Abbildung 4.11). Dieses Intermediat, möglicherweise p-Coumarinsäure, könnte die verminderte Repression der *PHANG*-Expression zur Folge haben. Im Umkehrschluss sollte die Verhinderung der Anreicherung dieses Intermediates zur Umkehrung des molekularen Phänotyps in den *gun* Mutanten führen. Tatsächlich führt die Verminderung des Flusses von Intermediaten in die Phenylpropanoidbiosynthese durch einen C4H-spezifischen Hemmstoff (PIP, Abbildung 3.79) zur Umkehrung des *gun* Phänotyps. In Anwesenheit von PIP wird die *PHANG*-Expression deutlich reduziert (*gun5*) oder erreicht sogar das WT-level (*gun4* Mutanten) nach NF-Behandlung (Abbildung 3.82). Dieses Ergebnis ist ein eindeutiger Beweis dafür, dass die De-regulation der Flavonoidbiosynthese und die sie begleitende Veränderung

im Intermediatfluss in diesen *gun* Mutanten die Ursache für die Entkopplung der *PHANG*-Expression ist (Abbildung 4.11).



**Abbildung 4.11: Arbeitsmodell zum Einfluss der Phenylpropanoidbiosynthese auf die Kerngenexpression in WT-Pflanzen und *gun* Mutanten nach NF-Behandlung.**

Es wird angenommen, dass die Hemmung der Plastidenentwicklung zur Stimulation der Flavonoidbiosynthese (insbesondere Anthocyane) führt. In WT-Pflanzen ist die Anreicherung von Anthocyanen nicht gestört (links). Im Gegensatz dazu, ist die Flavonoidbiosynthese in den *gun* Mutanten ab dem Schritt der CHS eingeschränkt (rechts). Es wird vermutet, dass eine akkumulierende Vorstufe (p-Coumarinsäure oder p-Coumaroyl CoA) zur Entkopplung der Kerngenexpression vom Plastidenzustand in den *gun* Mutanten beiträgt. Weitere Erläuterungen im Text.

Im quantitativen Vergleich zwischen *gun5* und *gun4* Mutanten ist erkennbar, dass die *gun4* Mutanten noch die größten Mengen von Anthocyanen akkumulieren können. Zeitgleich zeigen diese Mutanten eine im Vergleich zur *gun5* Mutante deutlich stärkere Repression der *PHANGs* (Abbildung 3.72).

Im Vergleich zur *gun5* Mutante könnte sich daher die Mutation von *GUN4* weniger stark auf die Störung der Flavonoidbiosynthese und damit auf den retrograden Signalweg auswirken. Anscheinend reicht die angewendete Konzentration von PIP aus, um die Akkumulation des Signalmoleküls in den *gun4* Mutanten unterhalb eines kritischen Schwellenwertes zu reduzieren. In der *gun5* Mutante hingegen kann die Akkumulation des Intermediates der Phenylpropanoidbiosynthese nur in einem nicht ausreichenden Umfang verhindert werden. Möglicherweise ist die CHS in der *gun5* Mutante stärker betroffen, was eine im Vergleich zu den *gun4* Mutanten verstärkte Akkumulation von Vorstufen zur Folge hätte. Dies könnte auch die Ursache für das Fortbestehen der Entkopplung der *PHANGs* in Anwesenheit von NF und PIP in der *gun1* und *tt4* Mutante sein (Abbildung 3.82). In der *knockout* Mutante für *CHS* (*tt4*) können auflaufende Vorstufen nicht metabolisiert werden. Da PIP keine vollständige Hemmung der C4H bewirkt (Abbildung 3.81), kommt es zwangsweise zur

Akkumulation von Intermediaten in der mit PIP und NF behandelten *tt4* Mutante und einem Fortbestehen der *PHANG*-Expression. Neben der *gun5* zeigte die *gun1* Mutante die stärkste Entkopplung der *PHANGs* und die geringste Akkumulation von Anthocyanen (Abbildung 3.72). Folglich könnte auch in dieser Mutante die Hemmung der C4H nicht ausreichen, um die *gun*-spezifische Entkopplung der *PHANGs* nach NF-Behandlung umzukehren.

Auf der anderen Seite könnte die PIP-insensitive *PHANG*-Entkopplung der *gun1* Mutante einen Hinweis zur Beantwortung einer bisher kontrovers diskutierten Frage sein: Ist die von GUN1 ausgehende retrograde Kommunikation (OGE-spezifisch) unabhängig vom retrograden Signal der TBS in den *gun2-6* Mutanten (Strand et al., 2003; Koussevitzky et al., 2007)? Die unterschiedliche Auswirkung von PIP auf die Stärke der *PHANG*-Expression nach NF-Behandlung in *gun1* sowie *gun4* und *gun5* könnte ein Beleg für diese Vermutung sein. Die TBS-spezifische retrograde Kommunikation könnte durch ein Signal aus der Phenylpropanoidbiosynthese vermittelt werden. Im Gegensatz dazu wäre das Signal aus der OGE unabhängig von dieser cytosolischen Komponente und könnte auf der Vermittlung durch die nicht-plastidären Komponenten PTM und ABI4 beruhen (Koussevitzky et al., 2007; Sun et al., 2011). Diese strikte Trennung beider Kommunikationswege hat jedoch eine entscheidende Limitierung. Warum zeigt die *gun1* Mutante dieselbe Beeinträchtigung der Flavonoidbiosynthese wie sie in TBS-spezifischen *gun* Mutanten zu beobachten war (Abbildung 3.72 und Abbildung 3.74)? Denkbar wäre, dass die OGE (GUN1-spezifisch) einen Einfluss auf die TBS-spezifische Kommunikation hat. Für die Verbindung beider plastidärer Prozesse spricht, dass die für die Synthese von Tetrapyrrolen notwendige tRNA<sup>GLU</sup> durch die OGE bereitgestellt werden muss. Andererseits zeigte sich, dass die OGE-abhängige retrograde Kommunikation in *sig2* Mutanten durch die TBS beeinflusst wird (Woodson et al., 2012). Zusätzlich interagiert GUN1 mit der D Untereinheit der MgCh und der FC1, die wiederum Komponenten des TBS-spezifischen Signalweges sind (Tadini et al., 2016). Wenngleich die physiologische Signifikanz dieser Interaktionen nicht aufgeklärt ist, unterstützt dieser Befund die Beeinflussung der TBS-abhängigen Kommunikation durch Komponenten der OGE. Auch die Tatsache, dass der GUN1-abhängige Signalweg durch Lincomycin (OGE-spezifisch) und NF (TBS-spezifisch) induziert werden kann, stellt beide Kommunikationswege in einen Zusammenhang. Wenngleich GUN1 die TBS-spezifische retrograde Kommunikation beeinflussen könnte, sind die OGE- und TBS-spezifischen Signalwege im Sinne einer Hierarchie demzufolge nicht gleichwertig. Da die retrograde Kommunikation in *gun1* durch die Verhinderung der Akkumulation von Phenylpropanoiden nicht wiederhergestellt werden kann, scheint die GUN1-PTM-ABI4-abhängige Kommunikation den TBS-abhängigen Signalweg zu dominieren. Anders gesagt, sind in der *gun1* Mutante beide Signalwege betroffen, aber der OGE-abhängige überlagert den TBS-spezifischen Signalweg.



Unabhängig vom Zusammenhang zwischen TBS- und OGE-spezifischer Kommunikation, konnte eine Verbindung zwischen den Intermediaten der Phenylpropanoidbiosynthese und den TBS-spezifischen *gun* Mutanten hergestellt werden. Die biochemischen und molekularbiologischen Experimente deuten darauf hin, dass die Entkopplung der *PHANGs* eine Folge der de-regulierten Flavonoidbiosynthese in den *gun* Mutanten ist. Es kann vermutet werden, dass ein Phenylpropanoid akkumuliert und als positives Signal die *PHANG*-Expression in den *gun4* und *gun5* Mutanten stimuliert. Die hier präsentierten Analysen ergänzen den TBS-spezifischen retrograden Signalweg um eine neu identifizierte cytosolische Komponente, die das (TBS-spezifische) retrograde GUN-Signal in Richtung des Zellkerns vermitteln könnte.

Im Folgenden soll ein Ausblick für weitere Experimente gegeben werden. In diesem Zusammenhang sollen gleichzeitig offene Fragen angesprochen und diskutiert werden. Zur Eingrenzung des spezifischen Signalmoleküls der GUN-vermittelten Kommunikation, können Mutanten der *PALs*, *C4H*, *4CLs* beitragen. Sollten *pal* und *c4h* Mutanten eine WT-artige *PHANG*-Expression zeigen, die *4cl* Mutanten hingegen *gun* Mutanten sein, würde es umso wahrscheinlicher, dass p-Coumarinsäure als Signalmolekül fungiert. Auch Metabolomanalysen der NF-behandelten Genotypen sollten einen Hinweis auf ein akkumulierendes Phenylpropanoid in den *gun* Mutanten liefern. Ferner sollte geprüft werden, ob die retrograde Kommunikation in *gun2*, *gun3* und *gun6* Mutanten ebenfalls von der Flavonoidbiosynthese beeinflusst wird. Hierfür sollte die *PHANG*-Expression in Anwesenheit von NF und PIP in den entsprechenden Genotypen analysiert werden. Unterstützt werden soll diese Analyse durch die Erzeugung weiterer transgener Linien. Um den Beweis zu erbringen, dass die Einschränkung der *CHS* in den *gun* Mutanten ursächlich für die *PHANG*-Entkopplung ist, sollte die *CHS* in den *gun* Mutanten überexprimiert werden. Dem aktuellen Modell entsprechend sollte die Überexpression der *CHS* zur Metabolisierung der Phenylpropanoide beitragen und somit das stimulierende Signal abschwächen. Gleichzeitig sollten Doppelmutanten von *gun/pal*, *gun/c4h* oder *gun/4cl* erzeugt werden. Analog zu PIP, sollte die Mutation von *pal* oder *c4h* im *gun* Hintergrund die Stärke der *PHANG*-Expression im Vergleich zu den Einzelmutanten nach NF-Behandlung reduzieren. Ferner wird vermutet, dass eine *gun/4cl* Doppelmutante sogar eine verstärkte *PHANG*-Expression im Vergleich zu den *gun* Mutanten zeigt. Der Ansatz mit den Doppelmutanten könnte auch klären, ob die retrograde Kommunikation von GUN1 (OGE-spezifisch) ebenfalls von der Phenylpropanoidbiosynthese beeinflusst wird. Beispielsweise könnte eine *gun1/c4h* weiterhin eine Entkopplung der *PHANGs*, eine *gun5/c4h* hingegen eine reduzierte *PHANG*-Expression nach NF-Behandlung zeigen. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob das durch den mobilen Transkriptionsfaktor PTM und ABI4 vermittelte GUN1-Signal (OGE) im Zusammenhang mit dem TBS-spezifischen Signal steht. Analog zu den Analysen an GUN1 sollte geprüft werden, ob die Überexpression von PTM oder ABI4 die De-regulation der *PHANGs* in *gun2-6* Mutanten beeinflusst

(Koussevitzky et al., 2007). Ebenfalls könnte untersucht werden, ob *ptm* oder *abi4* Mutanten ebenfalls eine Beeinträchtigung der Flavonoidbiosynthese zeigen und ob diese Beeinträchtigung einen Anteil an dem OGE-spezifischen retrograden Signal hat.

In Ergänzung zu den Untersuchungen der retrograden Kommunikation bei gestörter Plastidenentwicklung, scheint der funktionelle Zustand der Plastiden auch für die Anpassung an andere abiotische Stressbedingungen wichtig zu sein (diese Arbeit und Kindgren et al. (2015)). Die spezifische Beeinträchtigung der Flavonoidbiosynthese in *gun4* und *gun5* Mutanten führt zu einer verminderten Akkumulation von Anthocyanen unter Kältestress (Abbildung 3.27). Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass Komponenten der MgCh (GUN4 und GUN5) für diese Stressreaktion notwendig sind. Im Zusammenhang mit den Befunden zu den weiteren *gun* Mutanten, kann spekuliert werden, dass der GUN-abhängige Signalweg auch eine Rolle unter Bedingungen des *operational signaling* spielt. Daher sollten weitere Versuche angestrebt werden, die diese Verbindung bestätigen. Es sollte geprüft werden, ob eine *gun1* Mutante ebenfalls durch eine reduzierte Anthocyanakkumulation unter weiteren abiotischen Stressbedingungen charakterisiert ist. Mit Hilfe von zeitlich aufgelösten Wachstumskinetiken in Hochlicht oder Kälte kann die Dynamik der transkriptionellen und metabolischen Veränderungen in WT-Pflanzen und den *gun* Mutanten untersucht werden. Unter Kältestress akkumuliert die *gun5* Mutante deutlich reduzierte Mengen von Anthocyanen und zeigt einen im Vergleich zum WT hellen Phänotyp (Abbildung 3.27). Daher ist diese Mutante ein geeigneter Kandidat für einen Mutantenscreen. Die chemische Mutagenese (mit Ethylmethansulfonat, EMS) eines (reprimierenden) Faktors könnte zur Wiederherstellung der Anthocyanakkumulation in der *gun5* Mutante führen. Die sekundäre Mutation würde folglich *gun5* Mutanten mit verstärkter Anthocyanakkumulation hervorbringen, die somit rein optisch von den hellen *gun5* Mutanten im Kältestress zu unterscheiden wären. Auch könnte überprüft werden, ob die MgCh selbst oder eine ihrer Untereinheiten zur Induktion der Flavonoid-/ Anthocyanbiosynthese beiträgt. Möglicherweise führt die Überexpression von *CHLH* zur Stimulation der Anthocyanbiosynthese und damit sogar zu einer erhöhten Stressresistenz.

Neben der in dieser Arbeit festgestellten Beeinträchtigung der Flavonoidbiosynthese gibt es zwei weitere bisher nicht näher betrachtete Stoffwechselwege, die das GUN-vermittelte Signal beeinflussen könnten. Zum einen ist dies die plastidäre Phenylalaninsynthese. Zum anderen, die an die Phenylpropanoid-biosynthese gekoppelte Synthese von Lignin (Abschnitt 1.9.1, S.70). In zukünftigen Experimenten sollte hinterfragt werden, ob und in welchem Ausmaß diese beiden Synthesewege zur GUN-vermittelten retrograden Kommunikation beitragen. Ist der Export von Phenylalanin eine Voraussetzung für die Vermittlung des retrograden Signals? Beeinflussen die physiologischen Veränderungen in den *gun* Mutanten die plastidäre Phenylalaninsynthese? Ist die

Synthese oder der Export von Phenylalanin in den *gun* Mutanten verändert? Welchen Einfluss hat die Beeinträchtigung der Flavonoidbiosynthese auf die Synthese von Lignin und dessen Einlagerung in die Zellwand in den *gun* Mutanten? Beeinflussen Intermediate der Ligninsynthese die retrograde Kommunikation in den *gun* Mutanten? Im Zuge der Quantifizierung von Phenylalanin und Lignin und unter zur Hilfenahme von geeigneten Mutanten beider Stoffwechselwege (Tzin und Galili, 2010; Vanholme et al., 2012; Widhalm et al., 2015; Chen et al., 2016), können diese Fragen beantwortet und in Relation zum GUN-vermittelten retrograden Signal gestellt werden.

#### 4.4.5 Ursprung, Vermittlung und Konsequenz der GUN-vermittelten retrograden

##### Kommunikation: ein Arbeitsmodell

Im Laufe der vergangenen Jahre wurde eine Vielzahl von möglichen Quellen für das GUN-vermittelte retrograde Signal identifiziert. Neben der OGE (GUN1) wurde auch die TBS (GUN2-6) als Ursprung für ein Signalmolekül zur Kontrolle der *PHANG*-Expression während der Plastidenentwicklung beschrieben (Chan et al., 2015). Das von der OGE ausgehende Signal ist bisher nicht identifiziert. Im Gegensatz dazu sprechen die experimentellen Hinweise für Häm als TBS-spezifisches Signalmolekül während des *biogenic signaling* (Mochizuki et al., 2001; Koussevitzky et al., 2007; Woodson et al., 2011). In einem vereinfachten Modell soll das von der FC1 synthetisierte Häm Auskunft über den physiologischen Zustand der Plastiden geben. Es wird davon ausgegangen, dass die TBS-spezifischen *gun* Mutanten einen erhöhten Häm-Gehalt aufweisen. Unter Bedingungen die zur Inhibition der Plastidenentwicklung führen, soll dieses Häm sodann für die im Vergleich zum WT verstärkte *PHANG*-Expression in *gun* Mutanten verantwortlich sein (Woodson et al., 2011). Häm wirkt demzufolge als Stimulator der Kerngenexpression während der Plastidenentwicklung. Auf welchem Wege plastidäres Häm die Kerngenexpression beeinflussen kann, ist bisher nicht verstanden.

Wenngleich die experimentellen Hinweise für eine Häm-abhängige Regulation der *PHANGs* sprechen, liegt es in der Natur der Sache, dass dieses Modell hinterfragt wurde. Insbesondere der Umstand, dass die Untersuchungen zum retrograden Signalweg in den *gun* Mutanten meistens unter den artifiziellen Bedingungen der NF-Behandlung durchgeführt wurden, ist Bestandteil aktueller Kritik (diskutiert in Larkin (2014)).

##### 4.4.5.1 Das GUN-vermittelte Stresssignal ist unabhängig von ROS

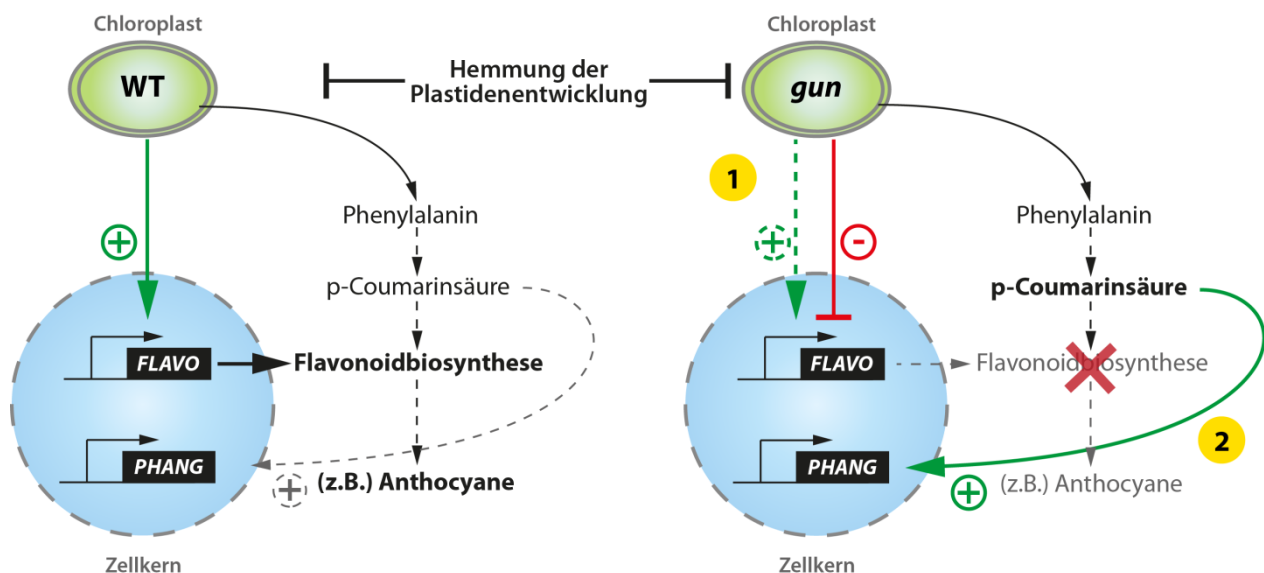
Die in dieser Arbeit beobachtete Induktion der Flavonoidbiosynthese und Akkumulation von Anthocyanen nach NF-Behandlung von WT-Pflanzen (Abbildung 3.72 und Abbildung 3.75) lässt vermuten, dass im Zuge der Hemmung der Plastidenentwicklung eine Stressantwort induziert wird. Denn, die Akkumulation von Anthocyanen wird generell als Antwort auf biotischen und abiotischen Stress verstanden (Diaz et al., 2006; Huang et al., 2010; Zhao und Tao, 2015; Commisso et al., 2016).

Ferner wurde beobachtet, dass Gene der Flavonoidbiosynthese als Antwort auf oxidativen Stress (z.B. Starklicht oder UV-B Strahlung) induziert werden (Willems et al., 2016).

Als Hemmstoff der Carotinoidsynthese verhindert NF den Aufbau des Photosyntheseapparates (fehlende Carotinoide in den PS-Komplexen). Durch die Funktion im Ableiten (überschüssiger) Lichtenergie (*non-photochemical quenching*), könnte der Verlust der Carotinoide zu erhöhten ROS-Gehalten führen (z.B. Singulett-Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid). Daher war es fraglich, ob der mit den *gun* Mutanten untersuchte und durch NF ausgelöste retrograde Signalweg nicht auch eine Antwort auf oxidativen Stress darstellt. Tatsächlich ist der durch NF ausgelöste Signalweg lichtabhängig (Voigt et al., 2010) und kann auch durch die Anwendung von Starklicht getriggert werden (Mochizuki et al., 2001). Zusammen mit der induzierten Anthocyanakkumulation nach NF-Behandlung könnte demnach ein ROS-abhängiges Signal als Grundlage für die GUN-vermittelte retrograde Kommunikation angenommen werden. Im Umkehrschluss könnte die De-regulation der *PHANGs* in den *gun* Mutanten durch geringere ROS-Gehalte oder eine gestörte Vermittlung des ROS-Signales bedingt werden. Dem steht jedoch gegenüber, dass NF-Behandlung von *Arabidopsis* Genotypen erst nach vollzogener Chloroplastenentwicklung zu erhöhten ROS-Gehalten führt. Keimen WT und *gun1* Mutanten hingegen in Anwesenheit von NF, werden keine ROS gebildet (Kim und Apel, 2013b). Zusätzlich zeigte sich, dass die Transkriptionsantwort auf die Hemmung der Plastidenentwicklung (NF) eindeutig von der Antwort auf ROS zu unterscheiden ist (Page et al., 2016; Willems et al., 2016). Die Expression von ROS-Markergenen in *gun* Mutanten ist im Vergleich zum NF-behandelten WT nicht verändert (Voigt et al., 2010). Folglich ist die NF-induzierte transkriptionelle Antwort unabhängig von einem ROS-signal oder einer gestörten Vermittlung dieses Signales. Mit diesen Befunden kann ebenfalls ausgeschlossen werden, dass ein geringerer ROS-Stress in den TBS-spezifischen *gun2-6* Mutanten ursächlich für die erhöhte *PHANG*-Expression nach NF-Behandlung ist. Es wurde spekuliert, dass die *gun2-6* Mutanten aufgrund eines verminderten Flusses von TBS-Intermediaten (siehe Abbildung 4.8, S.291) einer geringeren ROS-Exposition nach NF-Behandlung unterliegen (weniger Porphyrine führen zu geringerer Photosensibilisierung). Gegen diese Hypothese spricht die Beobachtung, dass eine Vielzahl von TBS Mutanten mit verringerten Porphyringehalten keine *gun* Mutanten sind (Abbildung 3.72 und Gadjieva et al. (2005); Voigt et al. (2010); Woodson et al. (2011)). Damit kann gleichzeitig der verminderte Fluss von TBS-Intermediaten als direkte Ursache für die in den *gun2-6* Mutanten beobachteten Effekte ausgeschlossen werden. Auffällig ist jedoch, dass die De-regulation der *PHANGs* in den *gun* Mutanten nur beobachtet werden kann, wenn die Plastidenentwicklung gehemmt wird. Unter Standardanzuchtsbedingungen akkumulieren *gun1*, *gun4* und *gun5* Mutanten dieselben Mengen von beispielsweise *LHCB1.2* Transkript (Susek et al., 1993; Koussevitzky et al., 2007; Peter und Grimm, 2009).

#### 4.4.5.2 Ist die Entkopplung der *PHANG*-Expression eine sekundäre Folge der gestörten Phenylpropanoid-/Flavonoidbiosynthese in *gun* Mutanten?

Wie zuvor diskutiert, sind die *gun* Mutanten durch eine reduzierte Fähigkeit zur Bildung von Flavonoiden (z.B. Anthocyane) charakterisiert. Das Ausbleiben der Anthocyanakkumulation kann dabei mit der verminderten Expression von Flavonoidbiosynthesegenen in den *gun* Mutanten korreliert werden (Abschnitt 4.4.2, S.292). Während WT-Pflanzen die Flavonoidbiosynthese und die Akkumulation von Anthocyanen nach NF-Behandlung induzieren, ist diese Reaktion in *gun* Mutanten abgeschwächt. Zum jetzigen Zeitpunkt ist noch nicht geklärt, ob in den *gun* Mutanten eine konstitutive oder stressinduzierte De-regulation der Flavonoidbiosynthesegene vorliegt. Offen ist auch, ob ein reprimierendes Signal von *gun* Plastiden ausgesendet wird oder ob das Fehlen eines positiven Signals zur reduzierten Expression der Flavonoidbiosynthesegene führt (Abbildung 4.12).



**Abbildung 4.12: Modell zum Einfluss der Phenylpropanoid-/Flavonoidbiosynthese auf die GUN-vermittelte retrograde Kommunikation.**

Im Zuge der Hemmung der Plastidenentwicklung wird die Expression von Flavonoidbiosynthesegenen (*FLAVO*) im WT stimuliert (links). Als Folge wird die Akkumulation von Anthocyanen beobachtet. Die ungehinderte Metabolisierung in WT-Pflanzen reduziert den stimulatorischen Einfluss von Phenylpropanoiden auf die Expression von *PHOTOSYNTHESIS-ASSOCIATED NUCLEAR GENES* (*PHANG*). Gemäß dem neuen Modell zur retrograden Kommunikation, sind die *gun* Mutanten primär durch eine eingeschränkte Flavonoidbiosynthese charakterisiert (1, rechts). Diese Einschränkung führt zur Akkumulation von Phenylpropanoiden (z.B. p-Coumarinsäure). Diese stimulieren in zweiter Konsequenz der *GUN*-Mutation die *PHANG*-Expression, wenn die Plastidenentwicklung inhibiert ist (2).

In Verbindung mit dem positiven Einfluss von p-Coumarinsäure auf die *PHANG*-Expression in WT-Pflanzen (Abbildung 3.80) und die Unterdrückung des *gun* Phänotyps durch die Hemmung der p-Coumarinsäure-Synthese in *gun4* und *gun5* Mutanten (Abbildung 3.82), wurde folgende Hypothese aufgestellt. Die Entkopplung der Kerngenenexpression vom Zustand der Plastiden könnte eine sekundäre Konsequenz der gestörten Phenylpropanoid-/Flavonoidbiosynthese in *gun* Mutanten sein.

Mit den neuen Befunden zum Einfluss der Phenylpropanoide auf die Kerngenexpression in NF-behandelten WT-Pflanzen und *gun* Mutanten könnte daher ein Paradigmenwechsel im Verständnis der GUN-vermittelten retrograden Kommunikation erfolgen. Bisher geht man davon aus, dass das primäre Ziel des GUN-abhängigen Signalweges die Regulation der *PHANG*-Expression ist. Ein von den GUN-Proteinen ausgehendes retrogrades Signal soll über, zum Teil noch unbekannte, cytosolische Komponenten direkt die Kerngenexpression steuern (z.B. *PHANGs*). In einem neuen Modell zur TBS-spezifischen GUN-abhängigen retrograden Kommunikation (Abbildung 4.12) würde sich dieses retrograde Signal jedoch zunächst auf die Expression von Flavonoidbiosynthesegenen auswirken. Die De-regulation der *PHANGs* in den (TBS-spezifischen) *gun* Mutanten würde erst in zweiter Konsequenz eine Folge der *gun* Mutationen sein (Abbildung 4.12). In WT-Pflanzen hingegen reduziert die ungehinderte Metabolisierung den stimulatorischen Einfluss von Phenylpropanoiden auf die Expression der *PHANGs*. Inwiefern und auf welchem Weg GUN1 oder die Beeinträchtigung der TBS in den *gun2-6* Mutanten die Expression von Flavonoidbiosynthesegenen reguliert, ist bisher unbekannt und bedarf weiterer Analysen. Die Phenylpropanoid- und Flavonoidbiosynthese sind zwei hochgradig regulierte Prozesse. Neben der post-translationalen Regulation ist insbesondere die Regulation der Transkription entscheidend für die Aktivität dieser Stoffwechselwege (Xu et al., 2015; Passeri et al., 2016). Die große Diversität von MYB-bHLH-WD40-Transkriptionsfaktoren, die die Expression von EBGs und LBGs regulieren (Abschnitt 1.9.2, S.72), erschwert die Suche nach einer simplen Antwort auf die Frage, durch welche transkriptionellen Vorgänge die Flavonoidbiosynthese in den *gun* Mutanten verändert ist.

In der Zusammenfassung könnte spekuliert werden, dass der cytosolische Gehalt von Phenylpropanoiden eine Auskunft über den Zustand der Plastiden gibt. Die Synthese von Phenylpropanoiden ist direkt mit der plastidären Phenylalaninsynthese gekoppelt (Widhalm et al., 2015). Phenylpropanoide nehmen wiederum einen Einfluss auf die Kerngenexpression (diese Arbeit und Vanholme et al. (2012)). Während reduzierte Phenylpropanoid-Gehalte in *pal* Mutanten eine reprimierende Wirkung entfalten, führt die Akkumulation von p-Coumarinsäure in *4cl* Mutanten zur Stimulation der *PHANGs* (Vanholme et al., 2012). Intermediate der Phenylpropanoidbiosynthese haben daher auch unter Standardanzuchtsbedingungen einen Einfluss auf die Expression von *PHANGs*. Die metabolische und regulatorische Verknüpfung zwischen Plastiden, Cytosol und Zellkern vereint alle notwendigen Komponenten eines (retrograden) Signalweges. Wie lassen sich aber die Befunde zu den *gun* Mutanten in Einklang mit dem Einfluss von Phenylpropanoiden auf die *PHANG*-Expression in WT-Pflanzen bringen?

Einerseits bildet ein sich entwickelnder Plastid Phenylalanin für die plastidäre Proteinbiosynthese. Andererseits wird dieses in das Cytosol abgegeben. Dort wird es innerhalb der cytosolischen Protein-,

Lignin- und Flavonoidbiosynthese genutzt. Lignin und Flavonoidbiosynthese sind an die Phenylpropanoidsynthese gekoppelt. Daher kann davon ausgegangen werden, dass ein gewisser *steady state* Gehalt von Phenylpropanoiden vorliegt, wenn die Prozesse im Chloroplasten nicht gestört sind. Diese könnten als Signal für die Expression von *PHANGs* dienen. Im Rahmen der Antwort auf abiotischen Stress (Temperatur, Licht) werden die plastidäre Phenylalaninsynthese (Kaplan et al., 2004) und zeitgleich die cytosolische Flavonoid/Anthocyanbiosynthese induziert (Zhao und Tao, 2015; Commisso et al., 2016). Es könnte spekuliert werden, dass im Zuge der verstärkten Synthese von beispielsweise Anthocyanen der Gehalt von Vorstufen in einer Zelle sinkt. Die reduzierten Gehalte von Phenylpropanoiden würden sodann eine geringere Expression von *PHANGs* bewirken. Aus dem physiologischen Kontext heraus ist dieser Weg zur Genregulation sinnvoll. Im Zuge eines Lichtstresses steigt die Gefahr zur Akkumulation von plastidären ROS, welche ihren Ursprung an den Photosynthesekomplexen haben können (Abschnitt 1.7.1, S.41). Um sich vor den negativen Konsequenzen von ROS zu schützen, werden zum einen ROS-detoxifizierende Mechanismen (Dismutasen, Peroxidasen) induziert (Asada, 2006; Pospisil, 2012). Auf der anderen Seite versucht die Pflanze die aufgenommene Menge an Licht zu reduzieren. Um dies zu erreichen wird die Bildung von Anthocyanen angeregt, welche einen Teil der einstrahlenden Lichtenergie abfangen (Passeri et al., 2016). Zeitgleich sollten die Ursachen für die ROS-Entstehung minimiert werden. Daher erscheint es sinnvoll, dass eine reduzierte Expression von Photosystemuntereinheiten mit einer reduzierten Phenylpropanoid- und erhöhten Anthocyangehalten einhergeht.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die adäquate metabolische und transkriptionelle Anpassung an eine Stressbedingung eine der größten Herausforderungen für eine Pflanze darstellt und nur im Konzert mehrerer Signalwege und physiologischer Reaktionen gelingen kann. Die verschiedenen Stimuli bedürfen individueller Antworten, die jedoch nicht losgelöst sind von anderen zellulären Prozessen. Die Vermeidung von Stress und die Reduktion negativer Konsequenzen kann daher immer nur durch das Zusammenspiel verschiedener Komponenten erzielt werden. Dabei macht die GUN-abhängige Kommunikation nur einen Teil der vielfältigen (Stress-)Antworten aus. Zukünftige Analysen werden dabei helfen den Zusammenhang zwischen der GUN-spezifischen retrograden Kommunikation und der cytosolischen Phenylpropanoid-/Flavonoidbiosynthese ausführlicher zu beschreiben. Zusätzlich wird sich zeigen inwiefern der GUN-abhängige Signalweg und der funktionelle Zustand der Plastiden auch über das Zeitfenster der Plastidenentwicklung hinaus (*biogenic signaling*) einen Einfluss auf die zelluläre Homöostase unter ungünstigen Wachstumsbedingungen hat (*operational signaling*).





## Literaturverzeichnis

- Abdallah F, Salamini F and Leister D (2000).** A prediction of the size and evolutionary origin of the proteome of chloroplasts of Arabidopsis. *Trends Plant Sci* **5**: 141-142.
- Acevedo-Hernandez GJ, Leon P and Herrera-Estrella LR (2005).** Sugar and ABA responsiveness of a minimal RBCS light-responsive unit is mediated by direct binding of ABI4. *Plant Journal* **43**: 506-519.
- Adams JA (2001).** Kinetic and Catalytic Mechanisms of Protein Kinases. *Chemistry Review* **101**: 2271-2290.
- Adams NB, Marklew CJ, Qian P, Brindley AA, Davison PA, Bullough PA and Hunter CN (2014).** Structural and functional consequences of removing the N-terminal domain from the magnesium chelatase ChlH subunit of *Thermosynechococcus elongatus*. *Biochem J* **464**: 315-322.
- Adams NB, Brindley AA, Hunter CN and Reid JD (2016).** The catalytic power of magnesium chelatase: a benchmark for the AAA(+) ATPases. *FEBS Lett* **590**: 1687-1693.
- Adhikari ND, Orler R, Chory J, Froehlich JE and Larkin RM (2009).** Porphyrins promote the association of GENOMES UNCOUPLED 4 and a Mg-chelatase subunit with chloroplast membranes. *J Biol Chem* **284**: 24783-24796.
- Adhikari ND, Froehlich JE, Strand DD, Buck SM, Kramer DM and Larkin RM (2011).** GUN4-porphyrin complexes bind the ChlH/GUN5 subunit of Mg-Chelatase and promote chlorophyll biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **23**: 1449-1467.
- Agati G and Tattini M (2010).** Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytol* **186**: 786-793.
- Agati G, Brunetti C, Di Ferdinando M, Ferrini F, Pollastri S and Tattini M (2013).** Functional roles of flavonoids in photoprotection: new evidence, lessons from the past. *Plant Physiol Biochem* **72**: 35-45.
- Alawady A, Reski R, Yaronskaya E and Grimm B (2005).** Cloning and expression of the tobacco CHLM sequence encoding Mg protoporphyrin IX methyltransferase and its interaction with Mg chelatase. *Plant Mol Biol* **57**: 679-691.
- Alawady AE and Grimm B (2005).** Tobacco Mg protoporphyrin IX methyltransferase is involved in inverse activation of Mg porphyrin and protoheme synthesis. *Plant J* **41**: 282-290.
- Albus CA, Salinas A, Czarnecki O, Kahlau S, Rothbart M, Thiele W, Lein W, Bock R, Grimm B and Schottler MA (2012).** LCAA, a novel factor required for magnesium protoporphyrin monomethylester cyclase accumulation and feedback control of aminolevulinic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol* **160**: 1923-1939.
- Allan AC, Hellens RP and Laing WA (2008).** MYB transcription factors that colour our fruit. *Trends Plant Sci* **13**: 99-102.
- Andersson SG, Karlberg O, Canback B and Kurland CG (2003).** On the origin of mitochondria: a genomics perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**: 165-177; discussion 177-169.
- Angerhofer A (1991).** Chlorophyll Triplets and Radicals. Photosystem I: The Light-Driven Plastocyanin: Ferredoxin Oxidoreductase. J. H. Golbeck, Springer Science & Business Media: 945-991.
- Apitz J, Schmied J, Lehmann MJ, Hedtke B and Grimm B (2014).** GluTR2 complements a hema1 mutant lacking glutamyl-tRNA reductase 1, but is differently regulated at the post-translational level. *Plant Cell Physiol* **55**: 645-657.
- Apitz J, Nishimura K, Schmied J, Wolf A, Hedtke B, van Wijk KJ and Grimm B (2016).** Posttranslational Control of ALA Synthesis Includes GluTR Degradation by Clp Protease and Stabilization by GluTR-Binding Protein. *Plant Physiol* **170**: 2040-2051.
- Appelhagen I, Thiedig K, Nordholt N, Schmidt N, Huet G, Sagasser M and Weisshaar B (2014).** Update on transparent testa mutants from Arabidopsis thaliana: characterisation of new alleles from an isogenic collection. *Planta* **240**: 955-970.
- Armstrong GA, Runge S, G. F, U. S and Apel K (1995).** Identification of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases A and B: a branched pathway for light-dependent chlorophyll biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.* : 1505-1517.
- Asada K (2006).** Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol* **141**: 391-396.

**Avendano-Vazquez AO, Cordoba E, Llamas E, San Roman C, Nisar N, De la Torre S, Ramos-Vega M, Gutierrez-Nava MD, Cazzonelli CI, Pogson BJ and Leon P (2014).** An Uncharacterized Apocarotenoid-Derived Signal Generated in zeta-Carotene Desaturase Mutants Regulates Leaf Development and the Expression of Chloroplast and Nuclear Genes in Arabidopsis. *Plant Cell* **26**: 2524-2537.

**Avissar YJ, Ormerod JG and Beale SI (1989).** Distribution of delta-aminolevulinic acid biosynthetic pathways among phototrophic bacterial groups. *Arch Microbiol* **151**: 513-519.

**Avissar YJ and Moberg PA (1995).** The common origin of the pigments of life - early steps of chlorophyll biosynthesis. *Photosynthesis Research* 221-242.

**Axelsson E, Lundqvist J, Sawicki A, Nilsson S, Schroder I, Al-Karadaghi S, Willows RD and Hansson M (2006).** Recessiveness and dominance in barley mutants deficient in Mg-chelatase subunit D, an AAA protein involved in chlorophyll biosynthesis. *Plant Cell* **18**: 3606-3616.

**Baginsky S, Tiller K and Link G (1997).** Transcription factor phosphorylation by a protein kinase associated with chloroplast RNA polymerase from mustard (*Sinapis alba*). *Plant Mol Biol* **34**: 181-189.

**Baginsky S, Tiller K, Pfannschmidt T and Link G (1999).** PTK, the chloroplast RNA polymerase-associated protein kinase from mustard (*Sinapis alba*), mediates redox control of plastid in vitro transcription. *Plant Mol Biol* **39**: 1013-1023.

**Baginsky S and Gruissem W (2009).** The chloroplast kinase network: new insights from large-scale phosphoproteome profiling. *Mol Plant* **2**: 1141-1153.

**Baginsky S (2016).** Protein phosphorylation in chloroplasts - a survey of phosphorylation targets. *J Exp Bot* **67**: 3873-3882.

**Balmer Y, Koller A, del Val G, Manieri W, Schurmann P and Buchanan BB (2003).** Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 370-375.

**Battersby AR (1985).** The Bakerian lecture, 1984. Biosynthesis of the pigments of life. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **225**: 1-26.

**Bayer RG, Stael S, Rocha AG, Mair A, Vothknecht UC and Teige M (2012).** Chloroplast-localized protein kinases: a step forward towards a complete inventory. *J Exp Bot* **63**: 1713-1723.

**Beale SI and Castelfranco PA (1973).** <sup>14</sup>C incorporation from exogenous compounds into -aminolevulinic acid by greening cucumber cotyledons. *Biochem Biophys Res Commun* **52**: 143-149.

**Beinfeld MC, Vishnuvardhan D, Blum A, Reynolds N, Fannous S, Kitagawa K and Marchand JE (2006).** Inhibition of prohormone convertase 1 (PC1) expression in cholecystokinin (CCK) expressing At-T20 cells decreased cellular content and secretion of CCK and caused a shift in molecular forms of CCK secreted. *Peptides* **27**: 905-910.

**Bellafore S, Barneche F, Peltier G and Rochaix JD (2005).** State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature* **433**: 892-895.

**Benli M, Schulz R and Apel K (1991).** Effect of light on the NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **16**: 615-625.

**Bennett J (1979).** Chloroplast phosphoproteins. Phosphorylation of polypeptides of the light-harvesting chlorophyll protein complex. *Eur J Biochem* **99**: 133-137.

**Bernal-Bayard P, Hervas M, Cejudo FJ and Navarro JA (2012).** Electron Transfer Pathways and Dynamics of Chloroplast NADPH-dependent Thioredoxin Reductase C (NTRC). *J Biol Chem* **287**: 33865-33872.

**Blankenship RE (2010).** Early evolution of photosynthesis. *Plant Physiol* **154**: 434-438.

**Blum H, Beier H and Gross HJ (1987).** Improved Silver Staining of Plant-Proteins, Rna and DNA in Polyacrylamide Gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99.

**Böddi B, Popovic R and Franck F (2003).** Early reactions of light-induced protochlorophyllide and chlorophyllide transformations analyzed in vivo at room temperature with a diode array spectrofluorometer. *J Photochem Photobiol B* **69**: 31-39.

**Bohrer AS, Massot V, Innocenti G, Reichheld JP, Issakidis-Bourguet E and Vanacker H (2012).** New insights into the reduction systems of plastidial thioredoxins point out the unique properties of thioredoxin z from *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **63**: 6315-6323.

- Bollivar D, Braumann I, Berendt K, Gough SP and Hansson M (2014).** The Ycf54 protein is part of the membrane component of Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase from barley (*Hordeum vulgare* L.). *FEBS J* **281**: 2377-2386.
- Bollivar DW, Jiang ZY, Bauer CE and Beale SI (1994a).** Heterologous expression of the bchM gene product from *Rhodobacter capsulatus* and demonstration that it encodes S-adenosyl-L-methionine:Mg-protoporphyrin IX methyltransferase. *J Bacteriol* **176**: 5290-5296.
- Bollivar DW, Suzuki JY, Beatty JT, Dobrowolski JM and Bauer CE (1994b).** Directed mutational analysis of bacteriochlorophyll a biosynthesis in *Rhodobacter capsulatus*. *J Mol Biol* **237**: 622-640.
- Bollivar DW and Beale SI (1996).** The Chlorophyll Biosynthetic Enzyme Mg-Protoporphyrin IX Monomethyl Ester (Oxidative) Cyclase (Characterization and Partial Purification from *Chlamydomonas reinhardtii* and *Synechocystis* sp. PCC 6803). *Plant Physiol* **112**: 105-114.
- Bonardi V, Pesaresi P, Becker T, Schleiff E, Wagner R, Pfannschmidt T, Jahns P and Leister D (2005).** Photosystem II core phosphorylation and photosynthetic acclimation require two different protein kinases. *Nature* **437**: 1179-1182.
- Bougri O and Grimm B (1996).** Members of a low-copy number gene family encoding glutamyl-tRNA reductase are differentially expressed in barley. *Plant J* **9**: 867-878.
- Bradbeer JW, Atkinson YE, Borner T and Hagemann R (1979).** Cytoplasmic Synthesis of Plastid Polypeptides May Be Controlled by Plastid-Synthesized Rna. *Nature* **279**: 816-817.
- Bräutigam K, Dietzel L, Kleine T, Stroher E, Wormuth D, Dietz KJ, Radke D, Wirtz M, Hell R, Dormann P, Nunes-Nesi A, Schauer N, Fernie AR, Oliver SN, Geigenberger P, Leister D and Pfannschmidt T (2009).** Dynamic plastid redox signals integrate gene expression and metabolism to induce distinct metabolic states in photosynthetic acclimation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 2715-2732.
- Breitenbach J, Zhu C and Sandmann G (2001).** Bleaching herbicide norflurazon inhibits phytoene desaturase by competition with the cofactors. *J Agric Food Chem* **49**: 5270-5272.
- Bryan AC, Obaidi A, Wierzba M and Tax FE (2012).** XYLEM INTERMIXED WITH PHLOEM1, a leucine-rich repeat receptor-like kinase required for stem growth and vascular development in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **235**: 111-122.
- Brzezowski P, Schlicke H, Richter A, Dent RM, Niyogi KK and Grimm B (2014).** The GUN4 protein plays a regulatory role in tetrapyrrole biosynthesis and chloroplast-to-nucleus signalling in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* **79**: 285-298.
- Brzezowski P, Richter AS and Grimm B (2015).** Regulation and function of tetrapyrrole biosynthesis in plants and algae. *Biochim Biophys Acta* **1847**: 968-985.
- Brzezowski P, Sharifi MN, Dent RM, Morhard MK, Niyogi KK and Grimm B (2016).** Mg chelatase in chlorophyll synthesis and retrograde signaling in *Chlamydomonas reinhardtii*: CHLI2 cannot substitute for CHLI1. *J Exp Bot* **67**: 3925-3938.
- Buchanan BB and Balmer Y (2005).** Redox regulation: a broadening horizon. *Annu Rev Plant Biol* **56**: 187-220.
- Buchanan BB, Holmgren A, Jacquot JP and Scheibe R (2012).** Fifty years in the thioredoxin field and a bountiful harvest. *Biochim Biophys Acta* **1820**: 1822-1829.
- Castelfranco PA, Weinstein JD, Schwarcz S, Pardo AD and Wezelman BE (1979).** The Mg insertion step in chlorophyll biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* **192**: 592-598.
- Cejudo FJ, Ferrandez J, Cano B, Puerto-Galan L and Guinea M (2012).** The function of the NADPH thioredoxin reductase C-2-Cys peroxiredoxin system in plastid redox regulation and signalling. *FEBS Lett* **586**: 2974-2980.
- Chan KX, Phua SY, Crisp P, McQuinn R and Pogson BJ (2015).** Learning the Languages of the Chloroplast: Retrograde Signaling and Beyond. *Annu Rev Plant Biol*.
- Chekounova E, Voronetskaya V, Papenbrock J, Grimm B and Beck CF (2001).** Characterization of *Chlamydomonas* mutants defective in the H subunit of Mg-chelatase. *Mol Genet Genomics* **266**: 363-373.
- Chen Q, Man C, Li D, Tan H, Xie Y and Huang J (2016).** Arogenate Dehydratase Isoforms Differentially Regulate Anthocyanin Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant*.

**Chen TC and Miller GW (1974).** Purification and characterization of uroporphyrinogen decarboxylase from tobacco leaves. *Plant Cell Physiol.* **15**: 993-1005.

**Chen X, Pu H, Fang Y, Wang X, Zhao S, Lin Y, Zhang M, Dai H-E, Gong W and Liu L (2015a).** Crystal structure of the catalytic subunit of magnesium chelatase. *Nature Plants*: 15125.

**Chen X, Pu H, Wang X, Long W, Lin R and Liu L (2015b).** Crystal Structures of GUN4 in Complex with Porphyrins. *Mol Plant* **8**: 1125-1127.

**Chen X, Pu H, Wang X, Long W, Lin R and Liu L (2015c).** Crystal structures of GUN4 in complex with porphyrins. *Mol Plant*.

**Chi W, Sun X and Zhang L (2013).** Intracellular signaling from plastid to nucleus. *Annu Rev Plant Biol* **64**: 559-582.

**Chi W, Feng P, Ma J and Zhang L (2015).** Metabolites and chloroplast retrograde signaling. *Curr Opin Plant Biol* **25**: 32-38.

**Chibani K, Couturier J, Selles B, Jacquot JP and Rouhier N (2010).** The chloroplastic thiol reducing systems: dual functions in the regulation of carbohydrate metabolism and regeneration of antioxidant enzymes, emphasis on the poplar redoxin equipment. *Photosynth Res* **104**: 75-99.

**Chory J, Peto CA, Ashbaugh M, Saganich R, Pratt L and Ausubel F (1989).** Different Roles for Phytochrome in Etiolated and Green Plants Deduced from Characterization of *Arabidopsis thaliana* Mutants. *Plant Cell* **1**: 867-880.

**Chow KS, Singh DP, Walker AR and Smith AG (1998).** Two different genes encode ferrochelatase in *Arabidopsis*: mapping, expression and subcellular targeting of the precursor proteins. *Plant J* **15**: 531-541.

**Clough SJ and Bent AF (1998).** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735-743.

**Colombo M, Tadini L, Peracchio C, Ferrari R and Pesaresi P (2016).** GUN1, a Jack-Of-All-Trades in Chloroplast Protein Homeostasis and Signaling. *Frontiers in Plant Science* **7**: 1427.

**Commisso M, Toffali K, Strazzer P, Stocchero M, Ceoldo S, Baldan B, Levi M and Guzzo F (2016).** Impact of Phenylpropanoid Compounds on Heat Stress Tolerance in Carrot Cell Cultures. *Frontiers in Plant Science* **7**: 1439.

**Cornah JE, Terry MJ and Smith AG (2003).** Green or red: what stops the traffic in the tetrapyrrole pathway? *Trends in Plant Science* **8**: 224-230.

**Cottage A, Mott EK, Kempster JA and Gray JC (2010).** The *Arabidopsis* plastid-signalling mutant *gun1* (*genomes uncoupled1*) shows altered sensitivity to sucrose and abscisic acid and alterations in early seedling development. *J Exp Bot* **61**: 3773-3786.

**Courtneidge SA (1985).** Activation of the pp60c-src kinase by middle T antigen binding or by dephosphorylation. *EMBO J* **4**: 1471-1477.

**Crouzet J, Levy-Schil S, Cameron B, Cauchois L, Rigault S, Rouyez MC, Blanche F, Debussche L and Thibaut D (1991).** Nucleotide sequence and genetic analysis of a 13.1-kilobase-pair *Pseudomonas denitrificans* DNA fragment containing five *cob* genes and identification of structural genes encoding Cob(I)alamin adenosyltransferase, cobalamin synthase, and bifunctional cobinamide kinase-cobinamide phosphate guanylyltransferase. *J Bacteriol* **173**: 6074-6087.

**Czarnecki O, Hedtke B, Melzer M, Rothbart M, Richter A, Schroter Y, Pfannschmidt T and Grimm B (2011).** An *Arabidopsis* GluTR binding protein mediates spatial separation of 5-aminolevulinic acid synthesis in chloroplasts. *Plant Cell* **23**: 4476-4491.

**Czarnecki O and Grimm B (2012).** Post-translational control of tetrapyrrole biosynthesis in plants, algae, and cyanobacteria. *J Exp Bot* **63**: 1675-1687.

**Czarnecki O and Grimm B (2013).** New insights in the topology of the biosynthesis of 5-aminolevulinic acid. *Plant Signal Behav* **8**: e23124.

**Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo G, Giustarini D and Milzani A (2009).** Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *Trends Biochem Sci* **34**: 85-96.

**Davis SJ, Kurepa J and Vierstra RD (1999).** The *Arabidopsis thaliana* HY1 locus, required for phytochrome-chromophore biosynthesis, encodes a protein related to heme oxygenases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6541-6546.

- Davison PA, Schubert HL, Reid JD, Iorg CD, Heroux A, Hill CP and Hunter CN (2005).** Structural and biochemical characterization of Gun4 suggests a mechanism for its role in chlorophyll biosynthesis. *Biochemistry* **44**: 7603-7612.
- Davison PA and Hunter CN (2011).** Abolition of magnesium chelatase activity by the gun5 mutation and reversal by Gun4. *FEBS Lett* **585**: 183-186.
- Debussche L, Couder M, Thibaut D, Cameron B, Crouzet J and Blanche F (1992).** Assay, purification, and characterization of cobaltochelatase, a unique complex enzyme catalyzing cobalt insertion in hydrogenobyrinic acid a,c-diamide during coenzyme B12 biosynthesis in *Pseudomonas denitrificans*. *J Bacteriol* **174**: 7445-7451.
- Diaz C, Saliba-Colombani V, Loudet O, Belluomo P, Moreau L, Daniel-Vedele F, Morot-Gaudry JF and Masclaux-Daubresse C (2006).** Leaf yellowing and anthocyanin accumulation are two genetically independent strategies in response to nitrogen limitation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **47**: 74-83.
- Dietz KJ and Hell R (2015).** Thiol switches in redox regulation of chloroplasts: balancing redox state, metabolism and oxidative stress. *Biol Chem* **396**: 483-494.
- Dietzel L, Glasser C, Liebers M, Hiekel S, Courtois F, Czarnecki O, Schlicke H, Zubo Y, Borner T, Mayer K, Grimm B and Pfannschmidt T (2015).** Identification of Early Nuclear Target Genes of Plastidial Redox Signals that Trigger the Long-Term Response of *Arabidopsis* to Light Quality Shifts. *Mol Plant* **8**: 1237-1252.
- Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C and Lepiniec L (2010).** MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* **15**: 573-581.
- Durnford DG and Falkowski PG (1997).** Chloroplast redox regulation of nuclear gene transcription during photoacclimation. *Photosynthesis Research* **53**: 229-241.
- Dyall SD, Brown MT and Johnson PJ (2004).** Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* **304**: 253-257.
- Dzelzkalns V, Foley T and Beale SI (1982).** Delta-Aminolevulinic acid synthase of *Euglena gracilis*: physical and kinetic properties. *Arch Biochem Biophys* **216**: 196-203.
- Emanuel C, Weihe A, Graner A, Hess WR and Borner T (2004).** Chloroplast development affects expression of phage-type RNA polymerases in barley leaves. *Plant J* **38**: 460-472.
- Emborg TJ, Walker JM, Noh B and Vierstra RD (2006).** Multiple heme oxygenase family members contribute to the biosynthesis of the phytochrome chromophore in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **140**: 856-868.
- Engelsberger WR and Schulze WX (2012).** Nitrate and ammonium lead to distinct global dynamic phosphorylation patterns when resupplied to nitrogen-starved *Arabidopsis* seedlings. *Plant J* **69**: 978-995.
- Espineda CE, Linford AS, Devine D and Brusslan JA (1999).** The AtCAO gene, encoding chlorophyll a oxygenase, is required for chlorophyll b synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 10507-10511.
- Estavillo GM, Crisp PA, Pornsiriwong W, Wirtz M, Collinge D, Carrie C, Giraud E, Whelan J, David P, Javot H, Brearley C, Hell R, Marin E and Pogson BJ (2011).** Evidence for a SAL1-PAP chloroplast retrograde pathway that functions in drought and high light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **23**: 3992-4012.
- Falciatore A, Merendino L, Barneche F, Ceol M, Meskauskiene R, Apel K and Rochaix JD (2005).** The FLP proteins act as regulators of chlorophyll synthesis in response to light and plastid signals in *Chlamydomonas*. *Genes Dev* **19**: 176-187.
- Ferreira GC, Franco R, Lloyd SG, Moura I, Moura JJ and Huynh BH (1995).** Structure and function of ferrochelatase. *J Bioenerg Biomembr* **27**: 221-229.
- Fey V, Wagner R, Brautigam K, Wirtz M, Hell R, Dietzmann A, Leister D, Oelmüller R and Pfannschmidt T (2005).** Retrograde plastid redox signals in the expression of nuclear genes for chloroplast proteins of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **280**: 5318-5328.
- Fischer BB, Hideg E and Krieger-Liszkay A (2013).** Production, detection, and signaling of singlet oxygen in photosynthetic organisms. *Antioxid Redox Signal* **18**: 2145-2162.

**Fodje MN, Hansson A, Hansson M, Olsen JG, Gough S, Willows RD and Al-Karadaghi S (2001).** Interplay between an AAA module and an integrin I domain may regulate the function of magnesium chelatase. *J Mol Biol* **311**: 111-122.

**Formighieri C, Ceol M, Bonente G, Rochaix JD and Bassi R (2012).** Retrograde signaling and photoprotection in a gun4 mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Plant* **5**: 1242-1262.

**Frankenberg N, Mukougawa K, Kohchi T and Lagarias JC (2001).** Functional genomic analysis of the HY2 family of ferredoxin-dependent bilin reductases from oxygenic photosynthetic organisms. *Plant Cell* **13**: 965-978.

**Fraser CM and Chapple C (2011).** The phenylpropanoid pathway in Arabidopsis. *Arabidopsis Book* **9**: e0152.

**Friso G and van Wijk KJ (2015).** Posttranslational Protein Modifications in Plant Metabolism. *Plant Physiol* **169**: 1469-1487.

**Fuentes I, Karcher D and Bock R (2012).** Experimental reconstruction of the functional transfer of intron-containing plastid genes to the nucleus. *Curr Biol* **22**: 763-771.

**Fuesler TP, Wong YS and Castelfranco PA (1984).** Localization of Mg-Chelatase and Mg-Protoporphyrin IX Monomethyl Ester (Oxidative) Cyclase Activities within Isolated, Developing Cucumber Chloroplasts. *Plant Physiol* **75**: 662-664.

**Funk C and Brodelius PE (1990).** Phenylpropanoid Metabolism in Suspension-Cultures of *Vanilla-Planifolia* Andr .2. Effects of Precursor Feeding and Metabolic-Inhibitors. *Plant Physiology* **94**: 95-101.

**Gadjieva R, Axelsson E, Olsson U and Hansson M (2005).** Analysis of gun phenotype in barley magnesium chelatase and Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase mutants. *Plant Physiol Biochem* **43**: 901-908.

**Galetskiy D, Lohscheider JN, Kononikhin AS, Popov IA, Nikolaev EN and Adamska I (2011).** Mass spectrometric characterization of photooxidative protein modifications in *Arabidopsis thaliana* thylakoid membranes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **25**: 184-190.

**Geigenberger P, Kolbe A and Tiessen A (2005).** Redox regulation of carbon storage and partitioning in response to light and sugars. *J Exp Bot* **56**: 1469-1479.

**Gibson KD, Laver WG and Neuberger A (1958).** Initial stages in the biosynthesis of porphyrins. 2. The formation of delta-aminolaevulinic acid from glycine and succinyl-coenzyme A by particles from chicken erythrocytes. *Biochem J* **70**: 71-81.

**Gibson LC, Willows RD, Kannangara CG, von Wettstein D and Hunter CN (1995).** Magnesium-protoporphyrin chelatase of *Rhodobacter sphaeroides*: reconstitution of activity by combining the products of the bchH, -I, and -D genes expressed in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 1941-1944.

**Gibson LC, Marrison JL, Leech RM, Jensen PE, Bassham DC, Gibson M and Hunter CN (1996).** A putative Mg chelatase subunit from *Arabidopsis thaliana* cv C24. Sequence and transcript analysis of the gene, import of the protein into chloroplasts, and in situ localization of the transcript and protein. *Plant Physiol* **111**: 61-71.

**Gibson LC, Jensen PE and Hunter CN (1999).** Magnesium chelatase from *Rhodobacter sphaeroides*: initial characterization of the enzyme using purified subunits and evidence for a Bchl-BchD complex. *Biochem J* **337 ( Pt 2)**: 243-251.

**Gigolashvili T, Geier M, Ashykhmina N, Frerigmann H, Wulfert S, Krueger S, Mugford SG, Kopriva S, Haferkamp I and Flugge UI (2012).** The *Arabidopsis* Thylakoid ADP/ATP Carrier TAAC Has an Additional Role in Supplying Plastidic Phosphoadenosine 5'-Phosphosulfate to the Cytosol. *Plant Cell* **24**: 4187-4204.

**Gigolashvili T and Kopriva S (2014).** Transporters in plant sulfur metabolism. *Front Plant Sci* **5**: 442.

**Gorchein A (1972).** Magnesium protoporphyrin chelatase activity in *Rhodospseudomonas spheroides*. Studies with whole cells. *Biochem J* **127**: 97-106.

**Gordon JA (1991).** Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Methods Enzymol* **201**: 477-482.

- Goslings D, Meskauskiene R, Kim C, Lee KP, Nater M and Apel K (2004).** Concurrent interactions of heme and FLU with Glu tRNA reductase (HEMA1), the target of metabolic feedback inhibition of tetrapyrrole biosynthesis, in dark- and light-grown Arabidopsis plants. *Plant J* **40**: 957-967.
- Gough SP and Kannangara CG (1978).** Biosynthesis of  $\Delta$ -aminolevulinate in greening barley leaves: glutamate 1-semialdehyde aminotransferase. *Carlsberg Res. Commun.* **43** 185-194.
- Gray JC, Sornarajah R, Zabron AA, Duckett CM and Khan MS (1995).** Chloroplast control of nuclear gene expression. In *Photosynthesis: From Light to Biosphere*. P. Mathis. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publisher. **3**.
- Griffiths WT (1978).** Reconstitution of chlorophyllide formation by isolated etioplast membranes. *Biochem J* **174**: 681-692.
- Grimm B, Bull A, Welinder KG, Gough SP and Kannangara CG (1989).** Purification and partial amino acid sequence of the glutamate 1-semialdehyde aminotransferase of barley and synechococcus. *Carlsberg Res Commun* **54**: 67-79.
- Haile DJ, Rouault TA, Harford JB and Klausner RD (1990).** The inhibition of the iron responsive element RNA-protein interaction by heme does not mimic in vivo iron regulation. *J Biol Chem* **265**: 12786-12789.
- Halliwell B, Rafter J and Jenner A (2005).** Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *Am J Clin Nutr* **81**: 268S-276S.
- Halliwell B and Gutteridge MCJ (2007).** *Free radicals in biology and medicine*, Oxford ; New York: Oxford University Press.
- Hambright P (1975).** Dynamic coordination chemistry of metalloporphyrins, . K.M. Smith (Ed.), *Porphyrins and Metalloporphyrins* (Elsevier, Amsterdam): 233-278.
- Hanks SK, Quinn AM and Hunter T (1988).** The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**: 42-52.
- Hansson A, Willows RD, Roberts TH and Hansson M (2002).** Three semidominant barley mutants with single amino acid substitutions in the smallest magnesium chelatase subunit form defective AAA+ hexamers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 13944-13949.
- Hansson M and Kannangara CG (1997).** ATPases and phosphate exchange activities in magnesium chelatase subunits of *Rhodobacter sphaeroides*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 13351-13356.
- Hansson M, Lundqvist J, Sirijovski N and Al-Karadaghi S (2013).** Magnesium Chelatase: The Molecular Motor of Chlorophyll Biosynthesis. **30**: 41-84.
- Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps JA and Kay SA (2000).** Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock. *Science* **290**: 2110-2113.
- Hart GJ and Battersby AR (1985).** Purification and properties of uroporphyrinogen III synthase (co-synthetase) from *Euglena gracilis*. *Biochem J* **232**: 151-160.
- Havaux M (2014).** Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. *Plant J* **79**: 597-606.
- Heberle J (2000).** Proton transfer reactions across bacteriorhodopsin and along the membrane. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1458**: 135-147.
- Hedtke B, Alawady A, Chen S, Bornke F and Grimm B (2007).** HEMA RNAi silencing reveals a control mechanism of ALA biosynthesis on Mg chelatase and Fe chelatase. *Plant Mol Biol* **64**: 733-742.
- Hennig M, Grimm B, Contestabile R, John RA and Jansson JN (1997).** Crystal structure of glutamate-1-semialdehyde aminomutase: an  $\alpha_2$ -dimeric vitamin B6-dependent enzyme with asymmetry in structure and active site reactivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 4866-4871.
- Hess WR, Muller A, Nagy F and Borner T (1994).** Ribosome-deficient plastids affect transcription of light-induced nuclear genes: genetic evidence for a plastid-derived signal. *Mol Gen Genet* **242**: 305-312.
- Hinchigeri SB, Hundle B and Richards WR (1997).** Demonstration that the BchH protein of *Rhodobacter capsulatus* activates S-adenosyl-L-methionine:magnesium protoporphyrin IX methyltransferase. *FEBS Lett* **407**: 337-342.
- Hohmann-Marriott MF and Blankenship RE (2011).** Evolution of photosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* **62**: 515-548.

**Hollingshead S, Kopecna J, Jackson PJ, Canniffe DP, Davison PA, Dickman MJ, Sobotka R and Hunter CN (2012).** Conserved chloroplast open-reading frame ycf54 is required for activity of the magnesium protoporphyrin monomethylester oxidative cyclase in *Synechocystis* PCC 6803. *J Biol Chem* **287**: 27823-27833.

**Holtorf H, Reinbothe S, Reinbothe C, Berezina B and Apel K (1995).** Two routes of chlorophyllide synthesis that are differentially regulated by light in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 3254-3258.

**Holtorf H and Apel K (1996).** Transcripts of the two NADPH protochlorophyllide oxidoreductase genes *PorA* and *PorB* are differentially degraded in etiolated barley seedlings. *Plant Mol Biol* **31**: 387-392.

**Huang J, Gu M, Lai Z, Fan B, Shi K, Zhou YH, Yu JQ and Chen Z (2010).** Functional analysis of the *Arabidopsis* PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiol* **153**: 1526-1538.

**Huang YS and Li HM (2009).** *Arabidopsis* CHL2 can substitute for CHL1. *Plant Physiol* **150**: 636-645.

**Huyer G, Liu S, Kelly J, Moffat J, Payette P, Kennedy B, Tsaprailis G, Gresser MJ and Ramachandran C (1997).** Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate. *J Biol Chem* **272**: 843-851.

**Ikegami A, Yoshimura N, Motohashi K, Takahashi S, Romano PG, Hisabori T, Takamiya K and Masuda T (2007).** The CHL1 subunit of *Arabidopsis thaliana* magnesium chelatase is a target protein of the chloroplast thioredoxin. *J Biol Chem* **282**: 19282-19291.

**Ilag L, Kumar AM and Sol D (1994).** Light Regulation of Chlorophyll Biosynthesis at the Level of 5-Aminolevulinate Formation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **6**: 265-275.

**Jaakola L (2013).** New insights into the regulation of anthocyanin biosynthesis in fruits. *Trends Plant Sci* **18**: 477-483.

**Jacobs JM and Jacobs NJ (1987).** Oxidation of protoporphyrinogen to protoporphyrin, a step in chlorophyll and haem biosynthesis. Purification and partial characterization of the enzyme from barley organelles. *Biochem J* **244**: 219-224.

**Jacobs JM, Jacobs NJ, Borotz SE and Gueriot ML (1990).** Effects of the photobleaching herbicide, acifluorfen-methyl, on protoporphyrinogen oxidation in barley organelles, soybean root mitochondria, soybean root nodules, and bacteria. *Arch Biochem Biophys* **280**: 369-375.

**Jensen P, Petersen B, Stummann B, Henningsen K, Willows R, Voithknecht U, Kannangara C and Wettstein D (1996a).** Structural genes for Mg-chelatase subunits in barley: *Xantha-f*, *-g* and *-h*. *Molecular and General Genetics MGG* **250**: 383-394.

**Jensen PE, Gibson LC, Henningsen KW and Hunter CN (1996b).** Expression of the *chlI*, *chlD*, and *chlH* genes from the Cyanobacterium *synechocystis* PCC6803 in *Escherichia coli* and demonstration that the three cognate proteins are required for magnesium-protoporphyrin chelatase activity. *J Biol Chem* **271**: 16662-16667.

**Jensen PE, Gibson LC and Hunter CN (1998).** Determinants of catalytic activity with the use of purified I, D and H subunits of the magnesium protoporphyrin IX chelatase from *Synechocystis* PCC6803. *Biochem J* **334 ( Pt 2)**: 335-344.

**Jensen PE, Gibson LC and Hunter CN (1999a).** ATPase activity associated with the magnesium-protoporphyrin IX chelatase enzyme of *Synechocystis* PCC6803: evidence for ATP hydrolysis during Mg<sup>2+</sup> insertion, and the MgATP-dependent interaction of the *ChlI* and *ChlD* subunits. *Biochem J* **339 ( Pt 1)**: 127-134.

**Jensen PE, Gibson LC, Shephard F, Smith V and Hunter CN (1999b).** Introduction of a new branchpoint in tetrapyrrole biosynthesis in *Escherichia coli* by co-expression of genes encoding the chlorophyll-specific enzymes magnesium chelatase and magnesium protoporphyrin methyltransferase. *FEBS Lett* **455**: 349-354.

**Jensen PE, Reid JD and Hunter CN (2000).** Modification of cysteine residues in the *ChlI* and *ChlH* subunits of magnesium chelatase results in enzyme inactivation. *Biochem J* **352 Pt 2**: 435-441.

**Jeong SY, Peffer N and Meier I (2004).** Phosphorylation by protein kinase CKII modulates the DNA-binding activity of a chloroplast nucleoid-associated protein. *Planta* **219**: 298-302.



- Jung H-S and Chory J (2010).** Signaling between chloroplasts and the nucleus: can a systems biology approach bring clarity to a complex and highly regulated pathway? *Plant Physiology* **152**: 453-459.
- Kada S, Koike H, Satoh K, Hase T and Fujita Y (2003).** Arrest of chlorophyll synthesis and differential decrease of Photosystems I and II in a cyanobacterial mutant lacking light-independent protochlorophyllide reductase. *Plant Mol Biol* **51**: 225-235.
- Kanekatsu M, Munakata H, Furuzono K and Ohtsuki K (1993).** Biochemical characterization of a 34 kDa ribonucleoprotein (p34) purified from the spinach chloroplast fraction as an effective phosphate acceptor for casein kinase II. *FEBS Lett* **335**: 176-180.
- Kannangara CG, Gough SP, Hansen B, Rasmussen JN and Simpson DJ (1977).** Homogenizer with Replaceable Razor Blades for Bulk Isolation of Active Barley Plastids. *Carlsberg Research Communications* **42**: 431-439.
- Kannangara CG, Andersen RV, Pontoppidan B, Willows R and von Wettstein D (1994).** Enzymic and mechanistic studies on the conversion of glutamate to 5-aminolaevulinate. *Ciba Found Symp* **180**: 3-20; discussion 21-25.
- Kannangara CG, Vothknecht UC, Hansson M and von Wettstein D (1997).** Magnesium chelatase: association with ribosomes and mutant complementation studies identify barley subunit Xantha-G as a functional counterpart of Rhodobacter subunit BchD. *Mol Gen Genet* **254**: 85-92.
- Kaplan F, Kopka J, Haskell DW, Zhao W, Schiller KC, Gatzke N, Sung DY and Guy CL (2004).** Exploring the temperature-stress metabolome of Arabidopsis. *Plant Physiol* **136**: 4159-4168.
- Karger GA, Reid JD and Hunter CN (2001).** Characterization of the binding of deuteroporphyrin IX to the magnesium chelatase H subunit and spectroscopic properties of the complex. *Biochemistry* **40**: 9291-9299.
- Kauss D, Bischof S, Steiner S, Apel K and Meskauskiene R (2012).** FLU, a negative feedback regulator of tetrapyrrole biosynthesis, is physically linked to the final steps of the Mg(++)-branch of this pathway. *FEBS Lett* **586**: 211-216.
- Kehoe JW and Bertozzi CR (2000).** Tyrosine sulfation: a modulator of extracellular protein-protein interactions. *Chemistry & Biology* **7**: R57-R61.
- Kikuchi G, Kumar A, Talmage P and Shemin D (1958).** The enzymatic synthesis of delta-aminolevulinic acid. *J Biol Chem* **233**: 1214-1219.
- Kim C, Meskauskiene R, Apel K and Laloi C (2008).** No single way to understand singlet oxygen signalling in plants. *EMBO Rep* **9**: 435-439.
- Kim C, Meskauskiene R, Zhang S, Lee KP, Lakshmanan Ashok M, Blajecka K, Herrfurth C, Feussner I and Apel K (2012).** Chloroplasts of Arabidopsis are the source and a primary target of a plant-specific programmed cell death signaling pathway. *Plant Cell* **24**: 3026-3039.
- Kim C and Apel K (2013a).** 1O<sub>2</sub>-mediated and EXECUTER-dependent retrograde plastid-to-nucleus signaling in norflurazon-treated seedlings of Arabidopsis thaliana. *Mol Plant* **6**: 1580-1591.
- Kim C and Apel K (2013b).** 1O<sub>2</sub>-Mediated and EXECUTER-Dependent Retrograde Plastid-to-Nucleus Signaling in Norflurazon-Treated Seedlings of Arabidopsis thaliana. *Mol Plant*.
- Kim JI, Shen Y, Han YJ, Park JE, Kirchenbauer D, Soh MS, Nagy F, Schafer E and Song PS (2004).** Phytochrome phosphorylation modulates light signaling by influencing the protein-protein interaction. *Plant Cell* **16**: 2629-2640.
- Kindgren P, Dubreuil C and Strand A (2015).** The Recovery of Plastid Function Is Required for Optimal Response to Low Temperatures in Arabidopsis. *PLoS One* **10**: e0138010.
- Kirchsteiger K, Pulido P, Gonzalez M and Cejudo FJ (2009).** NADPH Thioredoxin reductase C controls the redox status of chloroplast 2-Cys peroxiredoxins in Arabidopsis thaliana. *Mol Plant* **2**: 298-307.
- Kleffmann T, von Zychlinski A, Russenberger D, Hirsch-Hoffmann M, Gehrig P, Grisse W and Baginsky S (2007).** Proteome dynamics during plastid differentiation in rice. *Plant Physiol* **143**: 912-923.
- Kleine T and Leister D (2016).** Retrograde signaling: Organelles go networking. *Biochim Biophys Acta*.
- Kmiecik P, Leonardelli M and Teige M (2016).** Novel connections in plant organellar signalling link different stress responses and signalling pathways. *J Exp Bot* **67**: 3793-3807.

**Knogge W, Schmelzer E and Weissenböck G (1986).** The role of chalcone synthase in the regulation of flavonoid biosynthesis in developing oat primary leaves. *Arch Biochem Biophys* **250**: 364-372.

**Koch M, Breithaupt C, Kiefersauer R, Freigang J, Huber R and Messerschmidt A (2004).** Crystal structure of protoporphyrinogen IX oxidase: a key enzyme in haem and chlorophyll biosynthesis. *EMBO J* **23**: 1720-1728.

**Kohchi T, Mukougawa K, Frankenberg N, Masuda M, Yokota A and Lagarias JC (2001).** The Arabidopsis HY2 gene encodes phytochromobilin synthase, a ferredoxin-dependent biliverdin reductase. *Plant Cell* **13**: 425-436.

**Komori R, Amano Y, Ogawa-Ohnishi M and Matsubayashi Y (2009).** Identification of tyrosylprotein sulfotransferase in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 15067-15072.

**Kopečna J, Cabeza de Vaca I, Adams NB, Davison PA, Brindley AA, Hunter CN, Guallar V and Sobotka R (2015).** Porphyrin Binding to Gun4 Protein, Facilitated by a Flexible Loop, Controls Metabolite Flow through the Chlorophyll Biosynthetic Pathway. *J Biol Chem* **290**: 28477-28488.

**Koski VM, French CS and Smith JH (1951).** The action spectrum for the transformation of protochlorophyll to chlorophyll a in normal and albino corn seedlings. *Arch Biochem* **31**: 1-17.

**Koussevitzky S, Nott A, Mockler TC, Hong F, Sachetto-Martins G, Surpin M, Lim J, Mittler R and Chory J (2007).** Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science* **316**: 715-719.

**Kruse E, Grimm B, Beator J and Kloppstech K (1997).** Developmental and circadian control of the capacity for  $\delta$ -aminolevulinic acid synthesis in green barley. *Planta* **202**: 235-241.

**Kumar AM, Csankovszki G and Soll D (1996).** A second and differentially expressed glutamyl-tRNA reductase gene from Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol* **30**: 419-426.

**Laible M and Boonrod K (2009).** Homemade Site Directed Mutagenesis of Whole Plasmids. e1135.

**Larkin RM, Alonso JM, Ecker JR and Chory J (2003).** GUN4, a regulator of chlorophyll synthesis and intracellular signaling. *Science* **299**: 902-906.

**Larkin RM (2014).** Influence of plastids on light signalling and development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **369**: 20130232.

**Lebedev N and Timko MP (1998).** Protochlorophyllide photoreduction. *Photosynthesis Research* **58**: 5-23.

**Lee J-Y, Lee H-S, Song J-Y, Jung YJ, Reinbothe S, Park Y-I, Lee SY and Pai H-S (2013).** Cell growth defect factor1/CHAPERONE-LIKE PROTEIN OF POR1 plays a role in stabilization of light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**: 3944-3960.

**Lee KP, Kim C, Lee DW and Apel K (2003).** TIGRINA d, required for regulating the biosynthesis of tetrapyrroles in barley, is an ortholog of the FLU gene of Arabidopsis thaliana. *FEBS Letters* **553**: 119-124.

**Léger J, Kempf M, Lee G and Brandt R (1997).** Conversion of Serine to Aspartate Imitates Phosphorylation-induced Changes in the Structure and Function of Microtubule associated Protein Tau. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 8441-8446.

**Lehtimäki N, Koskela MM and Mulo P (2015).** Posttranslational Modifications of Chloroplast Proteins: An Emerging Field. *Plant Physiol* **168**: 768-775.

**Leister D (2003).** Chloroplast research in the genomic age. *Trends Genet* **19**: 47-56.

**Leon P, Gregorio J and Córdoba E (2012).** ABI4 and its role in chloroplast retrograde communication. *Front Plant Sci* **3**: 304.

**Lepistö A, Kangasjarvi S, Luomala EM, Brader G, Sipari N, Keranen M, Keinänen M and Rintamäki E (2009).** Chloroplast NADPH-thioredoxin reductase interacts with photoperiodic development in Arabidopsis. *Plant Physiol* **149**: 1261-1276.

**Lermontova I, Kruse E, Mock HP and Grimm B (1997).** Cloning and characterization of a plastidal and a mitochondrial isoform of tobacco protoporphyrinogen IX oxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 8895-8900.

- Leustek T, Smith M, Murillo M, Singh DP, Smith AG, Woodcock SC, Awan SJ and Warren MJ (1997).** Siroheme biosynthesis in higher plants. Analysis of an S-adenosyl-L-methionine-dependent uroporphyrinogen III methyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* **272**: 2744-2752.
- Li J, Almagro G, Munoz FJ, Baroja-Fernandez E, Bahaji A, Montero M, Hidalgo M, Sanchez-Lopez AM, Ezquer I, Sesma MT and Pozueta-Romero J (2012).** Post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase in response to light is not a major determinant of fine regulation of transitory starch accumulation in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell Physiol* **53**: 433-444.
- Lichtenthaler HK (1987).** Chlorophylls and Carotenoids - Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology* **148**: 350-382.
- Liere K and Link G (1997).** Chloroplast endoribonuclease p54 involved in RNA 3'-end processing is regulated by phosphorylation and redox state. *Nucleic Acids Res* **25**: 2403-2408.
- Lisitsky I and Schuster G (1995).** Phosphorylation of a chloroplast RNA-binding protein changes its affinity to RNA. *Nucleic Acids Res* **23**: 2506-2511.
- Little HN and Jones OT (1976).** The subcellular localization and properties of the ferrochelatase of etiolated barley. *Biochem J* **156**: 309-314.
- Lohrig K, Muller B, Davydova J, Leister D and Wolters DA (2009).** Phosphorylation site mapping of soluble proteins: bioinformatical filtering reveals potential plastidic phosphoproteins in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **229**: 1123-1134.
- Lohscheider JN, Rojas-Stutz MC, Rothbart M, Andersson U, Funck D, Mendgen K, Grimm B and Adamska I (2015).** Altered levels of LIL3 isoforms in *Arabidopsis* lead to disturbed pigment-protein assembly and chlorophyll synthesis, chlorotic phenotype and impaired photosynthetic performance. *Plant Cell Environ* **38**: 2115-2127.
- Lohscheider JN, Friso G and van Wijk KJ (2016).** Phosphorylation of plastoglobular proteins in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **67**: 3975-3984.
- Lotkowska ME, Tohge T, Fernie AR, Xue GP, Balazadeh S and Mueller-Roeber B (2015).** The *Arabidopsis* Transcription Factor MYB112 Promotes Anthocyanin Formation during Salinity and under High Light Stress. *Plant Physiol* **169**: 1862-1880.
- Lozano-Juste J, Colom-Moreno R and Leon J (2011).** In vivo protein tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **62**: 3501-3517.
- Lu Q, Ding S, Reiland S, Rodiger A, Roschitzki B, Xue P, Gruissem W, Lu C and Baginsky S (2015a).** Identification and characterization of chloroplast casein kinase II from *Oryza sativa* (rice). *J Exp Bot* **66**: 175-187.
- Lu Q, Helm S, Rodiger A and Baginsky S (2015b).** On the Extent of Tyrosine Phosphorylation in Chloroplasts. *Plant Physiol* **169**: 996-1000.
- Luer C, Schauer S, Mobius K, Schulze J, Schubert WD, Heinz DW, Jahn D and Moser J (2005).** Complex formation between glutamyl-tRNA reductase and glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase in *Escherichia coli* during the initial reactions of porphyrin biosynthesis. *J Biol Chem* **280**: 18568-18572.
- Lundquist PK, Davis JI and van Wijk KJ (2012).** ABC1K atypical kinases in plants: filling the organellar kinase void. *Trends Plant Sci* **17**: 546-555.
- Lundquist PK, Poliakov A, Giacomelli L, Friso G, Appel M, McQuinn RP, Krasnoff SB, Rowland E, Ponnala L, Sun Q and van Wijk KJ (2013).** Loss of plastoglobule kinases ABC1K1 and ABC1K3 causes conditional degreening, modified prenol-lipids, and recruitment of the jasmonic acid pathway. *Plant Cell* **25**: 1818-1839.
- Lundqvist J, Elmlund H, Wulff RP, Berglund L, Elmlund D, Emanuelsson C, Hebert H, Willows RD, Hansson M, Lindahl M and Al-Karadaghi S (2010).** ATP-induced conformational dynamics in the AAA+ motor unit of magnesium chelatase. *Structure* **18**: 354-365.
- Lundqvist J, Braumann I, Kurowska M, Muller AH and Hansson M (2013).** Catalytic turnover triggers exchange of subunits of the magnesium chelatase AAA+ motor unit. *J Biol Chem* **288**: 24012-24019.
- Luo T, Fan T, Liu Y, Rothbart M, Yu J, Zhou S, Grimm B and Luo M (2012).** Thioredoxin redox regulates ATPase activity of magnesium chelatase CHL1 subunit and modulates redox-mediated

signaling in tetrapyrrole biosynthesis and homeostasis of reactive oxygen species in pea plants. *Plant Physiol* **159**: 118-130.

**Maciejewski PM, Peterson FC, Anderson PJ and Brooks CL (1995).** Mutation of serine 90 to glutamic acid mimics phosphorylation of bovine prolactin. *J Biol Chem* **270**: 27661-27665.

**Maeda H and Dudareva N (2012).** The shikimate pathway and aromatic amino Acid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Biol* **63**: 73-105.

**Manara A, DalCorso G, Guzzo F and Furini A (2015).** Loss of the Atypical Kinases ABC1K7 and ABC1K8 Changes the Lipid Composition of the Chloroplast Membrane. *Plant Cell Physiol* **56**: 1193-1204.

**Manara A, DalCorso G and Furini A (2016).** The Role of the Atypical Kinases ABC1K7 and ABC1K8 in Absciscic Acid Responses. *Front Plant Sci* **7**: 366.

**Martinis J, Glauser G, Valimareanu S, Stettler M, Zeeman SC, Yamamoto H, Shikanai T and Kessler F (2014).** ABC1K1/PGR6 kinase: a regulatory link between photosynthetic activity and chloroplast metabolism. *Plant J* **77**: 269-283.

**Masuda T and Takamiya K (2004).** Novel Insights into the Enzymology, Regulation and Physiological Functions of Light-dependent Protochlorophyllide Oxidoreductase in Angiosperms. *Photosynth Res* **81**: 1-29.

**Matsumoto F, Obayashi T, Sasaki-Sekimoto Y, Ohta H, Takamiya K and Masuda T (2004).** Gene expression profiling of the tetrapyrrole metabolic pathway in Arabidopsis with a mini-array system. *Plant Physiol* **135**: 2379-2391.

**Matters GL and Beale SI (1995).** Blue-Light-Regulated Expression of Genes for Two Early Steps of Chlorophyll Biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* **109**: 471-479.

**Mauzerall D and Granick S (1956).** The occurrence and determination of delta-amino-levulinic acid and porphobilinogen in urine. *J Biol Chem* **219**: 435-446.

**Mayer SM, Beale SI and Weinstein JD (1987).** Enzymatic conversion of glutamate to delta-aminolevulinic acid in soluble extracts of *Euglena gracilis*. *J Biol Chem* **262**: 12541-12549.

**Mayfield SP and Taylor WC (1984).** Carotenoid-deficient maize seedlings fail to accumulate light-harvesting chlorophyll a/b binding protein (LHCP) mRNA. *Eur J Biochem* **144**: 79-84.

**Mc Cormac AC, Fischer A, Kumar AM, Söll D and Terry MJ (2001).** Regulation of *HEMA1* expression by phytochrome and a plastid signal during de-etiolation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **25**: 549-561.

**Mc Cormac AC and Terry MJ (2002).** Light-signalling pathways leading to the co-ordinated expression of *HEMA1* and *Lhcb* during chloroplast development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **32**: 549-559.

**Meguro M, Ito H, Takabayashi A, Tanaka R and Tanaka A (2011).** Identification of the 7-hydroxymethyl chlorophyll a reductase of the chlorophyll cycle in Arabidopsis. *Plant Cell* **23**: 3442-3453.

**Meskauskiene R, Nater M, Goslings D, Kessler F, op den Camp R and Apel K (2001).** FLU: a negative regulator of chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 12826-12831.

**Meskauskiene R and Apel K (2002).** Interaction of FLU, a negative regulator of tetrapyrrole biosynthesis, with the glutamyl-tRNA reductase requires the tetratricopeptide repeat domain of FLU. *FEBS Lett* **532**: 27-30.

**Michalska J, Zauber H, Buchanan BB, Cejudo FJ and Geigenberger P (2009).** NTRC links built-in thioredoxin to light and sucrose in regulating starch synthesis in chloroplasts and amyloplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 9908-9913.

**Misyura M, Colasanti J and Rothstein SJ (2013).** Physiological and genetic analysis of *Arabidopsis thaliana* anthocyanin biosynthesis mutants under chronic adverse environmental conditions. *Journal of Experimental Botany* **64**: 229-240.

**Mitchell P (1961).** Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic Type of Mechanism. *Nature* **191**: 144-&.

**Mochizuki N, Brusslan JA, Larkin R, Nagatani A and Chory J (2001).** Arabidopsis genomes uncoupled 5 (*GUN5*) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 2053-2058.

- Mochizuki N, Tanaka R, Tanaka A, Masuda T and Nagatani A (2008).** The steady-state level of Mg-protoporphyrin IX is not a determinant of plastid-to-nucleus signaling in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 15184-15189.
- Mochizuki N, Tanaka R, Grimm B, Masuda T, Moulin M, Smith AG, Tanaka A and Terry MJ (2010).** The cell biology of tetrapyrroles: a life and death struggle. *Trends Plant Sci* **15**: 488-498.
- Mock HP, Trainotti L, Kruse E and Grimm B (1995).** Isolation, sequencing and expression of cDNA sequences encoding uroporphyrinogen decarboxylase from tobacco and barley. *Plant Mol Biol* **28**: 245-256.
- Mock HP and Grimm B (1997).** Reduction of Uroporphyrinogen Decarboxylase by Antisense RNA Expression Affects Activities of Other Enzymes Involved in Tetrapyrrole Biosynthesis and Leads to Light-Dependent Necrosis. *Plant Physiol* **113**: 1101-1112.
- Moller IM and Sweetlove LJ (2010).** ROS signalling--specificity is required. *Trends Plant Sci* **15**: 370-374.
- Moore KL (2009).** Protein tyrosine sulfation: A critical posttranslation modification in plants and animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 14741-14742.
- Mork-Jansson A, Bue AK, Gargano D, Furnes C, Reisinger V, Arnold J, Kmiec K and Eichacker LA (2015a).** Lil3 Assembles with Proteins Regulating Chlorophyll Synthesis in Barley. *PLoS One* **10**: e0133145.
- Mork-Jansson AE, Gargano D, Kmiec K, Furnes C, Shevela D and Eichacker LA (2015b).** Lil3 dimerization and chlorophyll binding in Arabidopsis thaliana. *FEBS Lett* **589**: 3064-3070.
- Moser J, Schubert WD, Beier V, Bringemeier I, Jahn D and Heinz DW (2001).** V-shaped structure of glutamyl-tRNA reductase, the first enzyme of tRNA-dependent tetrapyrrole biosynthesis. *EMBO J* **20**: 6583-6590.
- Moulin M, McCormac AC, Terry MJ and Smith AG (2008).** Tetrapyrrole profiling in Arabidopsis seedlings reveals that retrograde plastid nuclear signaling is not due to Mg-protoporphyrin IX accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 15178-15183.
- Mugford SG, Matthewman CA, Hill L and Kopriva S (2010).** Adenosine-5'-phosphosulfate kinase is essential for Arabidopsis viability. *FEBS Lett* **584**: 119-123.
- Muramoto T, Kohchi T, Yokota A, Hwang I and Goodman HM (1999).** The Arabidopsis photomorphogenic mutant hy1 is deficient in phytochrome chromophore biosynthesis as a result of a mutation in a plastid heme oxygenase. *Plant Cell* **11**: 335-348.
- Murphy MJ, Siegel LM, Tove SR and Kamin H (1974).** Siroheme: a new prosthetic group participating in six-electron reduction reactions catalyzed by both sulfite and nitrite reductases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**: 612-616.
- Nikkanen L, Toivola J and Rintamaki E (2016).** Crosstalk between chloroplast thioredoxin systems in regulation of photosynthesis. *Plant Cell Environ* **39**: 1691-1705.
- Nishimura K, Apitz J, Friso G, Kim J, Ponnala L, Grimm B and van Wijk KJ (2015).** Discovery of a Unique Clp Component, ClpF, in Chloroplasts: A Proposed Binary ClpF-ClpS1 Adaptor Complex Functions in Substrate Recognition and Delivery. *Plant Cell* **27**: 2677-2691.
- Nott A, Jung HS, Koussevitzky S and Chory J (2006).** Plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 739-759.
- Nowicka B and Kruk J (2016).** Powered by light: Phototrophy and photosynthesis in prokaryotes and its evolution. *Microbiol Res* **186-187**: 99-118.
- Oelmuller R, Levitan I, Bergfeld R, Rajasekhar VK and Mohr H (1986).** Expression of Nuclear Genes as Affected by Treatments Acting on the Plastids. *Planta* **168**: 482-492.
- Oelmuller R and Mohr H (1986).** Photooxidative destruction of chloroplasts and its consequences for expression of nuclear genes. *Planta* **167**: 106-113.
- Ofran Y and Rost B (2007).** ISIS: interaction sites identified from sequence. *Bioinformatics* **23**: e13-16.
- Ogrzewalla K, Piotrowski M, Reinbothe S and Link G (2002).** The plastid transcription kinase from mustard (*Sinapis alba* L.). A nuclear-encoded CK2-type chloroplast enzyme with redox-sensitive function. *Eur J Biochem* **269**: 3329-3337.

**Ogura T and Wilkinson AJ (2001).** AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes Cells* **6**: 575-597.

**Oñate-Sánchez L and Vicente-Carbajosa J (2008).** DNA-free RNA isolation protocols for *Arabidopsis thaliana*, including seeds and siliques. *BMC Research Notes* **1**: 93.

**Oreb M, Zoryan M, Vojta A, Maier UG, Eichacker LA and Schleiff E (2007).** Phospho-mimicry mutant of atToc33 affects early development of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **581**: 5945-5951.

**Oster U, Bauer CE and Rudiger W (1997).** Characterization of chlorophyll a and bacteriochlorophyll a synthases by heterologous expression in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **272**: 9671-9676.

**Page MT, McCormac AC, Smith AG and Terry MJ (2016).** Singlet oxygen initiates a plastid signal controlling photosynthetic gene expression. *New Phytol*.

**Papenbrock J, Mock H-P, Kruse E and Grimm B (1999).** Expression studies in tetrapyrrole biosynthesis: inverse maxima of magnesium chelatase and ferrochelatase activity during cyclic photoperiods. *Planta* **208**: 264-273.

**Papenbrock J, Mock HP, Tanaka R, Kruse E and Grimm B (2000a).** Role of magnesium chelatase activity in the early steps of the tetrapyrrole biosynthetic pathway. *Plant Physiol* **122**: 1161-1169.

**Papenbrock J, Pfundel E, Mock HP and Grimm B (2000b).** Decreased and increased expression of the subunit CHL I diminishes Mg chelatase activity and reduces chlorophyll synthesis in transgenic tobacco plants. *Plant J* **22**: 155-164.

**Passeri V, Koes R and Quattrocchio FM (2016).** New Challenges for the Design of High Value Plant Products: Stabilization of Anthocyanins in Plant Vacuoles. *Front Plant Sci* **7**: 153.

**Perez-Ruiz JM, Spinola MC, Kirchsteiger K, Moreno J, Sahrawy M and Cejudo FJ (2006).** Rice NTRC is a high-efficiency redox system for chloroplast protection against oxidative damage. *Plant Cell* **18**: 2356-2368.

**Perez-Ruiz JM and Cejudo FJ (2009).** A proposed reaction mechanism for rice NADPH thioredoxin reductase C, an enzyme with protein disulfide reductase activity. *FEBS Lett* **583**: 1399-1402.

**Perez-Ruiz JM, Guinea M, Puerto-Galan L and Cejudo FJ (2014).** NADPH thioredoxin reductase C is involved in redox regulation of the Mg-chelatase I subunit in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Mol Plant* **7**: 1252-1255.

**Pesaresi P, Masiero S, Eubel H, Braun HP, Bhushan S, Glaser E, Salamini F and Leister D (2006).** Nuclear photosynthetic gene expression is synergistically modulated by rates of protein synthesis in chloroplasts and mitochondria. *Plant Cell* **18**: 970-991.

**Pesaresi P, Schneider A, Kleine T and Leister D (2007).** Interorganellar communication. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 600-606.

**Pesaresi P, Pribil M, Wunder T and Leister D (2011).** Dynamics of reversible protein phosphorylation in thylakoids of flowering plants: the roles of STN7, STN8 and TAP38. *Biochim Biophys Acta* **1807**: 887-896.

**Peter E and Grimm B (2009).** GUN4 is required for posttranslational control of plant tetrapyrrole biosynthesis. *Mol Plant* **2**: 1198-1210.

**Peter E, Rothbart M, Oelze ML, Shalygo N, Dietz KJ and Grimm B (2010).** Mg protoporphyrin monomethylester cyclase deficiency and effects on tetrapyrrole metabolism in different light conditions. *Plant Cell Physiol* **51**: 1229-1241.

**Peters A, Schneiderpoetsch HAW, Schwarz H and Weissenbock G (1988).** Biochemical and Immunological Characterization of Chalcone Synthase from Rye Leaves. *Journal of Plant Physiology* **133**: 178-182.

**Petersen BL, Jensen PE, Gibson LC, Stummann BM, Hunter CN and Henningsen KW (1998).** Reconstitution of an active magnesium chelatase enzyme complex from the bchl, -D, and -H gene products of the green sulfur bacterium *Chlorobium vibrioforme* expressed in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**: 699-704.

**Petrillo E, Godoy Herz MA, Fuchs A, Reifer D, Fuller J, Yanovsky MJ, Simpson C, Brown JW, Barta A, Kalyna M and Kornblihtt AR (2014).** A chloroplast retrograde signal regulates nuclear alternative splicing. *Science* **344**: 427-430.

- Petrussa E, Braidot E, Zancani M, Peresson C, Bertolini A, Patui S and Vianello A (2013).** Plant flavonoids--biosynthesis, transport and involvement in stress responses. *Int J Mol Sci* **14**: 14950-14973.
- Pfaffl MW (2001).** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: e45.
- Pogson BJ, Woo NS, Forster B and Small ID (2008).** Plastid signalling to the nucleus and beyond. *Trends Plant Sci* **13**: 602-609.
- Pontier D, Albrieux C, Joyard J, Lagrange T and Block MA (2007).** Knock-out of the magnesium protoporphyrin IX methyltransferase gene in Arabidopsis. Effects on chloroplast development and on chloroplast-to-nucleus signaling. *J Biol Chem* **282**: 2297-2304.
- Pontoppidan B and Kannangara CG (1994a).** Purification and partial characterisation of barley glutamyl-tRNA reductase, the enzyme that directs glutamate to chlorophyll biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* **225**: 529-537.
- Pontoppidan B and Kannangara CG (1994b).** Purification and partial characterisation of barley glutamyl-tRNA(Glu) reductase, the enzyme that directs glutamate to chlorophyll biosynthesis. *Eur J Biochem* **225**: 529-537.
- Pospisil P (2012).** Molecular mechanisms of production and scavenging of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochim Biophys Acta* **1817**: 218-231.
- Pribil M, Pesaresi P, Hertle A, Barbato R and Leister D (2010).** Role of plastid protein phosphatase TAP38 in LHClI dephosphorylation and thylakoid electron flow. *PLoS Biol* **8**: e1000288.
- Pulido P, Spinola MC, Kirchsteiger K, Guinea M, Pascual MB, Sahrawy M, Sandalio LM, Dietz KJ, Gonzalez M and Cejudo FJ (2010).** Functional analysis of the pathways for 2-Cys peroxiredoxin reduction in Arabidopsis thaliana chloroplasts. *J Exp Bot* **61**: 4043-4054.
- Puthiyaveetil S, Kavanagh TA, Cain P, Sullivan JA, Newell CA, Gray JC, Robinson C, van der Giezen M, Rogers MB and Allen JF (2008).** The ancestral symbiont sensor kinase CSK links photosynthesis with gene expression in chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 10061-10066.
- Puthiyaveetil S, Ibrahim IM and Allen JF (2012).** Oxidation-reduction signalling components in regulatory pathways of state transitions and photosystem stoichiometry adjustment in chloroplasts. *Plant Cell Environ* **35**: 347-359.
- Qian P, Marklew CJ, Viney J, Davison PA, Brindley AA, Soderberg C, Al-Karadaghi S, Bullough PA, Grossmann JG and Hunter CN (2012).** Structure of the cyanobacterial Magnesium Chelatase H subunit determined by single particle reconstruction and small-angle X-ray scattering. *J Biol Chem* **287**: 4946-4956.
- Ramel F, Birtic S, Ginies C, Soubigou-Taconnat L, Triantaphylides C and Havaux M (2012).** Carotenoid oxidation products are stress signals that mediate gene responses to singlet oxygen in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 5535-5540.
- Raux-Deery E, Leech HK, Nakrieko KA, McLean KJ, Munro AW, Heathcote P, Rigby SE, Smith AG and Warren MJ (2005).** Identification and characterization of the terminal enzyme of siroheme biosynthesis from Arabidopsis thaliana: a plastid-located sirohydrochlorin ferrochelatase containing a 2FE-2S center. *J Biol Chem* **280**: 4713-4721.
- Reid JD, Siebert CA, Bullough PA and Hunter CN (2003).** The ATPase activity of the ChII subunit of magnesium chelatase and formation of a heptameric AAA+ ring. *Biochemistry* **42**: 6912-6920.
- Reiland S, Messerli G, Baerenfaller K, Gerrits B, Endler A, Grossmann J, Gruissem W and Baginsky S (2009).** Large-scale Arabidopsis phosphoproteome profiling reveals novel chloroplast kinase substrates and phosphorylation networks. *Plant Physiol* **150**: 889-903.
- Reiland S, Finazzi G, Endler A, Willig A, Baerenfaller K, Grossmann J, Gerrits B, Rutishauser D, Gruissem W, Rochaix JD and Baginsky S (2011).** Comparative phosphoproteome profiling reveals a function of the STN8 kinase in fine-tuning of cyclic electron flow (CEF). *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 12955-12960.
- Reinbothe C, Apel K and Reinbothe S (1995a).** A light-induced protease from barley plastids degrades NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase complexed with chlorophyllide. *Mol Cell Biol* **15**: 6206-6212.

**Reinbothe C, El Bakkouri M, Buhr F, Muraki N, Nomata J, Kurisu G, Fujita Y and Reinbothe S (2010).** Chlorophyll biosynthesis: spotlight on protochlorophyllide reduction. *Trends Plant Sci* **15**: 614-624.

**Reinbothe S, Reinbothe C, Holtorf H and Apel K (1995b).** Two NADPH:Protochlorophyllide Oxidoreductases in Barley: Evidence for the Selective Disappearance of PORA during the Light-Induced Greening of Etiolated Seedlings. *Plant Cell* **7**: 1933-1940.

**Reinbothe S, Reinbothe C, Lebedev N and Apel K (1996).** PORA and PORB, Two Light-Dependent Protochlorophyllide-Reducing Enzymes of Angiosperm Chlorophyll Biosynthesis. *Plant Cell* **8**: 763-769.

**Reisinger V, Ploscher M and Eichacker LA (2008).** Lil3 assembles as chlorophyll-binding protein complex during deetiolation. *FEBS Lett* **582**: 1547-1551.

**Richly E and Leister D (2004).** An improved prediction of chloroplast proteins reveals diversities and commonalities in the chloroplast proteomes of Arabidopsis and rice. *Gene* **329**: 11-16.

**Richter A, Peter E, Pors Y, Lorenzen S, Grimm B and Czarnecki O (2010).** Rapid dark repression of 5-aminolevulinic acid synthesis in green barley leaves. *Plant Cell Physiol* **51**: 670-681.

**Richter AS and Grimm B (2013).** Thiol-based redox control of enzymes involved in the tetrapyrrole biosynthesis pathway in plants. *Front Plant Sci* **4**: 371.

**Richter AS, Peter E, Rothbart M, Schlicke H, Toivola J, Rintamaki E and Grimm B (2013).** Posttranslational influence of NADPH-dependent thioredoxin reductase C on enzymes in tetrapyrrole synthesis. *Plant Physiol* **162**: 63-73.

**Richter AS, Gartmann H, Fechner M, Rodiger A, Baginsky S and Grimm B (2016a).** Identification of four plastid-localized protein kinases. *FEBS Lett* **590**: 1749-1756.

**Richter AS, Hochheuser C, Fufezan C, Heinze L, Kuhnert F and Grimm B (2016b).** Phosphorylation of GENOMES UNCOUPLED 4 alters stimulation of Mg chelatase activity in angiosperms. *Plant Physiol* **accepted**.

**Richter AS, Wang P and Grimm B (2016c).** Arabidopsis Mg-Protoporphyrin IX Methyltransferase Activity and Redox Regulation Depend on Conserved Cysteines. *Plant Cell Physiol* **57**: 519-527.

**Rieble S and Beale SI (1988).** Transformation of glutamate to delta-aminolevulinic acid by soluble extracts of *Synechocystis* sp. PCC 6803 and other oxygenic prokaryotes. *J. Biol. Chem.* **263**: 8864-8871.

**Rieble S, Ormerod JG and Beale SI (1989).** Transformation of glutamate to delta-aminolevulinic acid by soluble extracts of *Chlorobium vibrioforme*. *J Bacteriol* **171**: 3782-3787.

**Rochaix JD, Lemeille S, Shapiguzov A, Samol I, Fucile G, Willig A and Goldschmidt-Clermont M (2012).** Protein kinases and phosphatases involved in the acclimation of the photosynthetic apparatus to a changing light environment. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **367**: 3466-3474.

**Rochaix JD (2013).** Redox regulation of thylakoid protein kinases and photosynthetic gene expression. *Antioxid Redox Signal* **18**: 2184-2201.

**Rockwell NC, Su YS and Lagarias JC (2006).** Phytochrome Structure and Signaling Mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology*,: 837-858.

**Rodiger A, Agne B, Baerenfaller K and Baginsky S (2014).** Arabidopsis proteomics: a simple and standardizable workflow for quantitative proteome characterization. *Methods Mol Biol* **1072**: 275-288.

**Rudiger W (2002).** Biosynthesis of chlorophyll b and the chlorophyll cycle. *Photosynth Res* **74**: 187-193.

**Rzeznicka K, Walker CJ, Westergren T, Kannangara CG, von Wettstein D, Merchant S, Gough SP and Hansson M (2005).** Xantha-I encodes a membrane subunit of the aerobic Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase involved in chlorophyll biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 5886-5891.

**Saito K, Yonekura-Sakakibara K, Nakabayashi R, Higashi Y, Yamazaki M, Tohge T and Fernie AR (2013).** The flavonoid biosynthetic pathway in Arabidopsis: structural and genetic diversity. *Plant Physiol Biochem* **72**: 21-34.



- Salinas P, Fuentes D, Vidal E, Jordana X, Echeverria M and Holuigue L (2006).** An extensive survey of CK2 alpha and beta subunits in Arabidopsis: multiple isoforms exhibit differential subcellular localization. *Plant Cell Physiol* **47**: 1295-1308.
- Scharfenberg M, Mittermayr L, E VONR-L, Schlicke H, Grimm B, Leister D and Kleine T (2015).** Functional characterization of the two ferrochelatases in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Environ* **38**: 280-298.
- Scheumann V, Ito H, Tanaka A, Schoch S and Rudiger W (1996).** Substrate specificity of chlorophyll(ide) b reductase in etioplasts of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Eur J Biochem* **242**: 163-170.
- Schlicke H, Hartwig AS, Firtzlaff V, Richter AS, Glasser C, Maier K, Finkemeier I and Grimm B (2014).** Induced deactivation of genes encoding chlorophyll biosynthesis enzymes disentangles tetrapyrrole-mediated retrograde signaling. *Mol Plant* **7**: 1211-1227.
- Schmitz-Linneweber C and Small I (2008).** Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends Plant Sci* **13**: 663-670.
- Schoch GA, Nikov GN, Alworth WL and Werck-Reichhart D (2002).** Chemical inactivation of the cinnamate 4-hydroxylase allows for the accumulation of salicylic acid in elicited cells. *Plant Physiol* **130**: 1022-1031.
- Schönberg A and Baginsky S (2012).** Signal integration by chloroplast phosphorylation networks: an update. *Front Plant Sci* **3**: 256.
- Schönberg A, Bergner E, Helm S, Agne B, Dunschede B, Schunemann D, Schutkowski M and Baginsky S (2014).** The peptide microarray "ChloroPhos1.0" identifies new phosphorylation targets of plastid casein kinase II (pCKII) in Arabidopsis thaliana. *PLoS One* **9**: e108344.
- Schubert HL, Raux E, Wilson KS and Warren MJ (1999).** Common chelatase design in the branched tetrapyrrole pathways of heme and anaerobic cobalamin synthesis. *Biochemistry* **38**: 10660-10669.
- Serrato AJ, Perez-Ruiz JM, Spinola MC and Cejudo FJ (2004).** A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem* **279**: 43821-43827.
- Sewelam N, Jaspert N, Van Der Kelen K, Tognetti VB, Schmitz J, Frerigmann H, Stahl E, Zeier J, Van Breusegem F and Maurino VG (2014).** Spatial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling specificity: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from chloroplasts and peroxisomes modulates the plant transcriptome differentially. *Mol Plant* **7**: 1191-1210.
- Shepherd M, Reid JD and Hunter CN (2003).** Purification and kinetic characterization of the magnesium protoporphyrin IX methyltransferase from *Synechocystis* PCC6803. *Biochem J* **371**: 351-360.
- Shepherd M, McLean S and Hunter CN (2005).** Kinetic basis for linking the first two enzymes of chlorophyll biosynthesis. *FEBS J* **272**: 4532-4539.
- Siemenroth A, Wollgiehn R, Neumann D and Borner T (1981).** Synthesis of ribosomal RNA in ribosome-deficient plastids of the mutant "albostrians" of *Hordeum vulgare* L. *Planta* **153**: 547-555.
- Siepkner LJ, Ford M, de Kock R and Kramer S (1987).** Purification of bovine protoporphyrinogen oxidase: immunological cross-reactivity and structural relationship to ferrochelatase. *Biochim Biophys Acta* **913**: 349-358.
- Singh DP, Cornah JE, Hadingham S and Smith AG (2002).** Expression analysis of the two ferrochelatase genes in Arabidopsis in different tissues and under stress conditions reveals their different roles in haem biosynthesis. *Plant Molecular Biology* **50**: 773-788.
- Singh R, Singh S, Parihar P, Singh VP and Prasad SM (2015).** Retrograde signaling between plastid and nucleus: A review. *J Plant Physiol* **181**: 55-66.
- Sirijovski N, Lundqvist J, Rosenback M, Elmlund H, Al-Karadaghi S, Willows RD and Hansson M (2008).** Substrate-binding model of the chlorophyll biosynthetic magnesium chelatase BchH subunit. *J Biol Chem* **283**: 11652-11660.
- Smith SJ and Cox TM (1997).** Translational control of erythroid delta-aminolevulinate synthase in immature human erythroid cells by heme. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **43**: 103-114.
- Snyders S and Kohorn BD (1999).** TAKs, Thylakoid Membrane Protein Kinases Associated with Energy Transduction. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 9137-9140.

**Snyders S and Kohorn BD (2001).** Disruption of thylakoid-associated kinase 1 leads to alteration of light harvesting in Arabidopsis. *J Biol Chem* **276**: 32169-32176.

**Sobotka R, Duhring U, Komenda J, Peter E, Gardian Z, Tichy M, Grimm B and Wilde A (2008).** Importance of the cyanobacterial Gun4 protein for chlorophyll metabolism and assembly of photosynthetic complexes. *J Biol Chem* **283**: 25794-25802.

**Spinola MC, Perez-Ruiz JM, Pulido P, Kirchsteiger K, Guinea M, Gonzalez M and Cejudo FJ (2008).** NTRC new ways of using NADPH in the chloroplast. *Physiol Plant* **133**: 516-524.

**Sreeramulu S, Mostizky Y, Sunitha S, Shani E, Nahum H, Salomon D, Hayun LB, Gruetter C, Rauh D, Ori N and Sessa G (2013).** BSKs are partially redundant positive regulators of brassinosteroid signaling in Arabidopsis. *Plant J* **74**: 905-919.

**Srivastava A, Lake V, Nogaj LA, Mayer SM, Willows RD and Beale SI (2005).** The *Chlamydomonas reinhardtii* gtr gene encoding the tetrapyrrole biosynthetic enzyme glutamyl-trna reductase: structure of the gene and properties of the expressed enzyme. *Plant Mol Biol* **58**: 643-658.

**Stegemann S and Bock R (2006).** Experimental reconstruction of functional gene transfer from the tobacco plastid genome to the nucleus. *Plant Cell* **18**: 2869-2878.

**Stenbaek A, Hansson A, Wulff RP, Hansson M, Dietz KJ and Jensen PE (2008).** NADPH-dependent thioredoxin reductase and 2-Cys peroxiredoxins are needed for the protection of Mg-protoporphyrin monomethyl ester cyclase. *FEBS Lett* **582**: 2773-2778.

**Stenbaek A and Jensen PE (2010).** Redox regulation of chlorophyll biosynthesis. *Phytochemistry* **71**: 853-859.

**Stracke R, Ishihara H, Hupé G, Barsch A, Mehrtens F, Niehaus K and Weisshaar B (2007).** Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the Arabidopsis thaliana seedling. *Plant J* **50**: 660-677.

**Strand A, Asami T, Alonso J, Ecker JR and Chory J (2003).** Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrinIX. *Nature* **421**: 79-83.

**Strand A (2004).** Plastid-to-nucleus signalling. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 621-625.

**Su Q, Frick G, Armstrong G and Apel K (2001).** POR C of Arabidopsis thaliana: a third light- and NADPH-dependent protochlorophyllide oxidoreductase that is differentially regulated by light. *Plant Molecular Biology* **47**: 805-813.

**Sugiyama N, Nakagami H, Mochida K, Daudi A, Tomita M, Shirasu K and Ishihama Y (2008).** Large-scale phosphorylation mapping reveals the extent of tyrosine phosphorylation in Arabidopsis. *Mol Syst Biol* **4**: 193.

**Sullivan JA and Gray JC (1999).** Plastid translation is required for the expression of nuclear photosynthesis genes in the dark and in roots of the pea *lip1* mutant. *Plant Cell* **11**: 901-910.

**Sun X, Feng P, Xu X, Guo H, Ma J, Chi W, Lin R, Lu C and Zhang L (2011).** A chloroplast envelope-bound PHD transcription factor mediates chloroplast signals to the nucleus. *Nat Commun* **2**: 477.

**Susek RE, Ausubel FM and Chory J (1993).** Signal transduction mutants of Arabidopsis uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development. *Cell* **74**: 787-799.

**Tadini L, Pesaresi P, Kleine T, Rossi F, Guljamow A, Sommer F, Muhlhaus T, Schroda M, Masiero S, Pribil M, Rothbart M, Hedtke B, Grimm B and Leister D (2016).** GUN1 Controls Accumulation of the Plastid Ribosomal Protein S1 at the Protein Level and Interacts with Proteins Involved in Plastid Protein Homeostasis. *Plant Physiol* **170**: 1817-1830.

**Takahashi K, Takabayashi A, Tanaka A and Tanaka R (2014).** Functional analysis of light-harvesting-like protein 3 (LIL3) and its light-harvesting chlorophyll-binding motif in Arabidopsis. *J Biol Chem* **289**: 987-999.

**Takahashi M, Shigeto J, Sakamoto A, Izumi S, Asada K and Morikawa H (2015).** Dual selective nitration in Arabidopsis: Almost exclusive nitration of PsbO and PsbP, and highly susceptible nitration of four non-PSII proteins, including peroxiredoxin II E. *Electrophoresis* **36**: 2569-2578.

**Tanaka R, Yoshida K, Nakayashiki T, Masuda T, Tsuji H, Inokuchi H and Tanaka A (1996).** Differential expression of two hema mRNAs encoding glutamyl-tRNA reductase proteins in greening cucumber seedlings. *Plant Physiol* **110**: 1223-1230.

- Tanaka R and Tanaka A (2007).** Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. *Annu Rev Plant Biol* **58**: 321-346.
- Tanaka R, Rothbart M, Oka S, Takabayashi A, Takahashi K, Shibata M, Myouga F, Motohashi R, Shinozaki K, Grimm B and Tanaka A (2010).** LIL3, a light-harvesting-like protein, plays an essential role in chlorophyll and tocopherol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 16721-16725.
- Tanaka R, Kobayashi K and Masuda T (2011).** Tetrapyrrole Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book*: e0145.
- Tanaka R and Tanaka A (2011).** Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes. *Biochim Biophys Acta* **1807**: 968-976.
- Tanaka Y, Sasaki N and Ohmiya A (2008).** Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J* **54**: 733-749.
- Tarahi Tabrizi S, Langley DB, Harrop SJ, Duff AP and Willows RD (2015).** Structure of GUN4 from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* **71**: 1094-1099.
- Tarahi Tabrizi S, Sawicki A, Zhou S, Luo M and Willows RD (2016).** GUN4-protoporphyrin IX is a singlet oxygen generator with consequences for plastid retrograde signalling. *J Biol Chem*.
- Terry MJ and Smith AG (2013).** A model for tetrapyrrole synthesis as the primary mechanism for plastid-to-nucleus signaling during chloroplast biogenesis. *Front Plant Sci* **4**: 14.
- Thormahlen I, Ruber J, von Roepenack-Lahaye E, Ehrlich SM, Massot V, Hummer C, Tezycka J, Issakidis-Bourguet E and Geigenberger P (2013).** Inactivation of thioredoxin f1 leads to decreased light activation of ADP-glucose pyrophosphorylase and altered diurnal starch turnover in leaves of *Arabidopsis* plants. *Plant Cell Environ* **36**: 16-29.
- Tikkanen M and Aro EM (2012).** Thylakoid protein phosphorylation in dynamic regulation of photosystem II in higher plants. *Biochim Biophys Acta* **1817**: 232-238.
- Tohge T, Nishiyama Y, Hirai MY, Yano M, Nakajima J, Awazuhara M, Inoue E, Takahashi H, Goodenowe DB, Kitayama M, Noji M, Yamazaki M and Saito K (2005).** Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants over-expressing an MYB transcription factor. *Plant J* **42**: 218-235.
- Toivola J, Nikkanen L, Dahlstrom KM, Salminen TA, Lepisto A, Vignols HF and Rintamaki E (2013).** Overexpression of chloroplast NADPH-dependent thioredoxin reductase in *Arabidopsis* enhances leaf growth and elucidates in vivo function of reductase and thioredoxin domains. *Front Plant Sci* **4**: 389.
- Tottey S, Block MA, Allen M, Westergren T, Albrieux C, Scheller HV, Merchant S and Jensen PE (2003).** *Arabidopsis* CHL27, located in both envelope and thylakoid membranes, is required for the synthesis of protochlorophyllide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 16119-16124.
- Triantaphylides C, Krischke M, Hoeberichts FA, Ksas B, Gresser G, Havaux M, Van Breusegem F and Mueller MJ (2008).** Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. *Plant Physiol* **148**: 960-968.
- Triantaphylides C and Havaux M (2009).** Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends Plant Sci* **14**: 219-228.
- Trotta A, Suorsa M, Rantala M, Lundin B and Aro EM (2016).** Serine and threonine residues of plant STN7 kinase are differentially phosphorylated upon changing light conditions and specifically influence the activity and stability of the kinase. *Plant J*.
- Tzin V and Galili G (2010).** The Biosynthetic Pathways for Shikimate and Aromatic Amino Acids in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Book* **8**: e0132.
- Ujwal ML, McCormac AC, Goulding A, Madan Kumar A, Söll D and Terry MJ (2002).** Divergent regulation of the HEMA gene family encoding glutamyl-tRNA reductase in *Arabidopsis thaliana*: expression of HEMA2 is regulated by sugars, but is independent of light and plastid signalling. *Plant Molecular Biology* **50**: 81-89.
- Vale RD (2000).** AAA proteins. Lords of the ring. *J Cell Biol* **150**: F13-19.
- van Wijk KJ, Friso G, Walther D and Schulze WX (2014).** Meta-Analysis of *Arabidopsis thaliana* Phospho-Proteomics Data Reveals Compartmentalization of Phosphorylation Motifs. *Plant Cell* **26**: 2367-2389.

**Vanholme R, Storme V, Vanholme B, Sundin L, Christensen JH, Goeminne G, Halpin C, Rohde A, Morreel K and Boerjan W (2012).** A systems biology view of responses to lignin biosynthesis perturbations in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**: 3506-3529.

**Vasileuskaya Z, Oster U and Beck CF (2005).** Mg-protoporphyrin IX and heme control HEMA, the gene encoding the first specific step of tetrapyrrole biosynthesis, in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* **4**: 1620-1628.

**Vavilin DV and Vermaas WF (2002).** Regulation of the tetrapyrrole biosynthetic pathway leading to heme and chlorophyll in plants and cyanobacteria. *Physiol Plant* **115**: 9-24.

**Verdecia MA, Larkin RM, Ferrer JL, Riek R, Chory J and Noel JP (2005).** Structure of the Mg-chelatase cofactor GUN4 reveals a novel hand-shaped fold for porphyrin binding. *PLoS Biol* **3**: e151.

**Vermaas WFJ (2001).** *Evolution of Photosynthesis*. *eLS*, John Wiley & Sons, Ltd.

**Vinti G, Hills A, Campbell S, Bowyer JR, Mochizuki N, Chory J and Lopez-Juez E (2000).** Interactions between *hy1* and *gun* mutants of *Arabidopsis*, and their implications for plastid/nuclear signalling. *Plant J* **24**: 883-894.

**Vogel MO, Moore M, Konig K, Pecher P, Alsharafa K, Lee J and Dietz KJ (2014).** Fast retrograde signaling in response to high light involves metabolite export, MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE6, and AP2/ERF transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**: 1151-1165.

**Voigt C, Oster U, Bornke F, Jahns P, Dietz KJ, Leister D and Kleine T (2010).** In-depth analysis of the distinctive effects of norflurazon implies that tetrapyrrole biosynthesis, organellar gene expression and ABA cooperate in the GUN-type of plastid signalling. *Physiol Plant* **138**: 503-519.

**von Gromoff ED, Alawady A, Meinecke L, Grimm B and Beck CF (2008).** Heme, a plastid-derived regulator of nuclear gene expression in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* **20**: 552-567.

**Vothknecht UC, Kannangara CG and von Wettstein D (1998).** Barley glutamyl tRNA<sup>Glu</sup> reductase: mutations affecting haem inhibition and enzyme activity. *Phytochemistry* **47**: 513-519.

**Walker CJ and Weinstein JD (1991a).** In vitro assay of the chlorophyll biosynthetic enzyme Mg-chelatase: resolution of the activity into soluble and membrane-bound fractions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 5789-5793.

**Walker CJ and Weinstein JD (1991b).** Further characterization of the magnesium chelatase in isolated developing cucumber chloroplasts : substrate specificity, regulation, intactness, and ATP requirements. *Plant Physiol* **95**: 1189-1196.

**Walker CJ and Weinstein JD (1994).** The magnesium-insertion step of chlorophyll biosynthesis is a two-stage reaction. *Biochem J* **299 ( Pt 1)**: 277-284.

**Walker CJ and Willows RD (1997).** Mechanism and regulation of Mg-chelatase. *Biochem J* **327 ( Pt 2)**: 321-333.

**Walker JE, Saraste M, Runswick MJ and Gay NJ (1982).** Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* **1**: 945-951.

**Wang P, Xue L, Batelli G, Lee S, Hou YJ, Van Oosten MJ, Zhang H, Tao WA and Zhu JK (2013).** Quantitative phosphoproteomics identifies SnRK2 protein kinase substrates and reveals the effectors of abscisic acid action. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 11205-11210.

**War AR, Paulraj MG, Ahmad T, Buhroo AA, Hussain B, Ignacimuthu S and Sharma HC (2012).** Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal Behav* **7**: 1306-1320.

**Weigel D and Glazebrook J (2002).** *Arabidopsis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Weinstein JD and Beale SI (1985).** Enzymatic conversion of glutamate to delta-aminolevulinate in soluble extracts of the unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*. *Arch Biochem Biophys* **237**: 454-464.

**Weinstein JD, Howell RW, Leverette RD, Grooms SY, Brignola PS, Mayer SM and Beale SI (1993).** Heme Inhibition of [delta]-Aminolevulinic Acid Synthesis Is Enhanced by Glutathione in Cell-Free Extracts of *Chlorella*. *Plant Physiol.* **101**: 657-665.

**Widhalm JR, Gutensohn M, Yoo H, Adebessin F, Qian YC, Guo LY, Jaini R, Lynch JH, McCoy RM, Shreve JT, Thimmapuram J, Rhodes D, Morgan JA and Dudareva N (2015).** Identification of a

plastidial phenylalanine exporter that influences flux distribution through the phenylalanine biosynthetic network. *Nature Communications* **6**.

**Wilde A, Mikolajczyk S, Alawady A, Lokstein H and Grimm B (2004)**. The *gun4* gene is essential for cyanobacterial porphyrin metabolism. *FEBS Lett* **571**: 119-123.

**Willems P, Mhamdi A, Stael S, Storme V, Kerchev P, Noctor G, Gevaert K and Van Breusegem F (2016)**. The ROS Wheel: Refining ROS Transcriptional Footprints. *Plant Physiol* **171**: 1720-1733.

**Willig A, Shapiguzov A, Goldschmidt-Clermont M and Rochaix JD (2011)**. The phosphorylation status of the chloroplast protein kinase STN7 of *Arabidopsis* affects its turnover. *Plant Physiol* **157**: 2102-2107.

**Willows RD, Gibson LC, Kanangara CG, Hunter CN and von Wettstein D (1996)**. Three separate proteins constitute the magnesium chelatase of *Rhodobacter sphaeroides*. *Eur J Biochem* **235**: 438-443.

**Willows RD and Beale SI (1998)**. Heterologous expression of the *Rhodobacter capsulatus* Bchl, -D, and -H genes that encode magnesium chelatase subunits and characterization of the reconstituted enzyme. *J Biol Chem* **273**: 34206-34213.

**Willows RD, Hansson A, Birch D, Al-Karadaghi S and Hansson M (2004)**. EM single particle analysis of the ATP-dependent Bchl complex of magnesium chelatase: an AAA+ hexamer. *J Struct Biol* **146**: 227-233.

**Wilson KE and Huner NP (2000)**. The role of growth rate, redox-state of the plastoquinone pool and the trans-thylakoid  $\Delta pH$  in photoacclimation of *Chlorella vulgaris* to growth irradiance and temperature. *Planta* **212**: 93-102.

**Wind JJ, Peviani A, Snel B, Hanson J and Smeekens SC (2013)**. ABI4: versatile activator and repressor. *Trends Plant Sci* **18**: 125-132.

**Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV and Provart NJ (2007)**. An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* **2**: e718.

**Woodard SI and Dailey HA (1995)**. Regulation of heme biosynthesis in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* **316**: 110-115.

**Woodson JD and Chory J (2008)**. Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nat Rev Genet* **9**: 383-395.

**Woodson JD, Perez-Ruiz JM and Chory J (2011)**. Heme synthesis by plastid ferrochelatase I regulates nuclear gene expression in plants. *Curr Biol* **21**: 897-903.

**Woodson JD, Perez-Ruiz JM, Schmitz RJ, Ecker JR and Chory J (2012)**. Sigma factor-mediated plastid retrograde signals control nuclear gene expression. *Plant J*.

**Wulff RP, Lundqvist J, Rutsdottir G, Hansson A, Stenbaek A, Elmlund D, Elmlund H, Jensen PE and Hansson M (2011)**. The activity of barley NADPH-dependent thioredoxin reductase C is independent of the oligomeric state of the protein: tetrameric structure determined by cryo-electron microscopy. *Biochemistry* **50**: 3713-3723.

**Wunder T, Liu Q, Aseeva E, Bonardi V, Leister D and Pribil M (2013a)**. Control of STN7 transcript abundance and transient STN7 dimerisation are involved in the regulation of STN7 activity. *Planta* **237**: 541-558.

**Wunder T, Xu W, Liu Q, Wanner G, Leister D and Pribil M (2013b)**. The major thylakoid protein kinases STN7 and STN8 revisited: effects of altered STN8 levels and regulatory specificities of the STN kinases. *Front Plant Sci* **4**: 417.

**Xiao Y, Savchenko T, Baidoo EE, Chehab WE, Hayden DM, Tolstikov V, Corwin JA, Kliebenstein DJ, Keasling JD and Dehesh K (2012)**. Retrograde signaling by the plastidial metabolite MEcPP regulates expression of nuclear stress-response genes. *Cell* **149**: 1525-1535.

**Xiao Y, Wang J and Dehesh K (2013)**. Review of stress specific organelles-to-nucleus metabolic signal molecules in plants. *Plant Sci* **212**: 102-107.

**Xu W, Doshi A, Lei M, Eck MJ and Harrison SC (1999)**. Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol Cell* **3**: 629-638.

**Xu W, Dubos C and Lepiniec L (2015).** Transcriptional control of flavonoid biosynthesis by MYB-bHLH-WDR complexes. *Trends Plant Sci* **20**: 176-185.

**Yachdav G, Kloppmann E, Kajan L, Hecht M, Goldberg T, Hamp T, Honigschmid P, Schafferhans A, Roos M, Bernhofer M, Richter L, Ashkenazy H, Punta M, Schlessinger A, Bromberg Y, Schneider R, Vriend G, Sander C, Ben-Tal N and Rost B (2014).** PredictProtein--an open resource for online prediction of protein structural and functional features. *Nucleic Acids Res* **42**: W337-343.

**Yang M, Huang H, Zhang C, Wang Z, Su Y, Zhu P, Guo Y and Deng XW (2016).** Arabidopsis atypical kinase ABC1K1 is involved in red light-mediated development. *Plant Cell Rep* **35**: 1213-1220.

**Yang YS, Wang CC, Chen BH, Hou YH, Hung KS and Mao YC (2015).** Tyrosine Sulfation as a Protein Post-Translational Modification. *Molecules* **20**: 2138-2164.

**Yaronskaya E, Vershilovskaya I, Poers Y, Alawady AE, Averina N and Grimm B (2006).** Cytokinin effects on tetrapyrrole biosynthesis and photosynthetic activity in barley seedlings. *Planta* **224**: 700-709.

**Ytterberg AJ, Peltier JB and van Wijk KJ (2006).** Protein profiling of plastoglobules in chloroplasts and chromoplasts. A surprising site for differential accumulation of metabolic enzymes. *Plant Physiol* **140**: 984-997.

**Zhang D, Kato Y, Zhang L, Fujimoto M, Tsutsumi N, Sodmergen and Sakamoto W (2010).** The FtsH protease heterocomplex in Arabidopsis: dispensability of type-B protease activity for proper chloroplast development. *Plant Cell* **22**: 3710-3725.

**Zhang F, Gonzalez A, Zhao M, Payne CT and Lloyd A (2003).** A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of Arabidopsis. *Development* **130**: 4859-4869.

**Zhang F, Tang W, Hedtke B, Zhong L, Liu L, Peng L, Lu C, Grimm B and Lin R (2014).** Tetrapyrrole biosynthetic enzyme protoporphyrinogen IX oxidase 1 is required for plastid RNA editing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 2023-2028.

**Zhang M, Zhang F, Fang Y, Chen X, Chen Y, Zhang W, Dai HE, Lin R and Liu L (2015).** The Non-canonical Tetratricopeptide-repeat (TPR) Domain of FLUORESCENT (FLU) Mediates Complex Formation with Glutamyl-tRNA Reductase. *J Biol Chem*.

**Zhao A, Fang Y, Chen X, Zhao S, Dong W, Lin Y, Gong W and Liu L (2014).** Crystal structure of Arabidopsis glutamyl-tRNA reductase in complex with its stimulator protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**: 6630-6635.

**Zhao D and Tao J (2015).** Recent advances on the development and regulation of flower color in ornamental plants. *Front Plant Sci* **6**: 261.

**Zhao S, Jiang Y, Zhao Y, Huang S, Yuan M, Zhao Y and Guo Y (2016).** Casein Kinase1-Like Protein2 Regulates Actin Filament Stability and Stomatal Closure via Phosphorylation of Actin Depolymerizing Factor. *Plant Cell*.

**Zhou S, Sawicki A, Willows RD and Luo M (2012).** C-terminal residues of *Oryza sativa* GUN4 are required for the activation of the ChlH subunit of magnesium chelatase in chlorophyll synthesis. *FEBS Lett* **586**: 205-210.

**Zolnierowicz S and Bollen M (2000).** Protein phosphorylation and protein phosphatases. De Panne, Belgium, September 19-24, 1999. *EMBO J* **19**: 483-488.

## Anhang I – Primer

**Tabelle XXII: Genutzte Primer.** qPCR, *quantitative real-time PCR*. SDM, *site directed mutagenesis*. Rek. Express., rekombinante Proteinexpression

Genname		Gen/Linie	Sequenz	Verwendung
<b>Transkriptanalysen</b>				
<b>Referenzgene</b>				
SAND	fwd	AT2G28390	AACTCTATGCAGCATTTGATCCACT	qPCR
	rev		TGATTGCATATCTTTATCGCCATC	qPCR
PEX4	fwd	AT5G25760	CCTCTTAAGTGCAGCTCAGG	qPCR
	rev		TTTGTGCCATTGAATTGAACCC	qPCR
ACTIN-2	fwd	AT3G18780	CTTCCTCAGCAGCATTCAG	qPCR
	rev		GACCTGCCTCATCACTCG	qPCR
<b>Tetrapyrrolsynthese</b>				
HEMA1	fwd	AT1G58290	TTGCTGCCAACAAAGAAGAC	qPCR
	rev		CCGTCTCCAATGAATCCCTC	qPCR
HEMA2	fwd	AT1G09940	AGAAGATTAGAGCAAAGGTGGA	qPCR
	rev		TTCACCTCTACTCAAGTGTG	qPCR
GSA1	fwd	AT5G63570	TCAAAGAAGAGCGACACAGAG	qPCR
	rev		GTAAACACCTTCTTCAACATTCC	qPCR
GSA2	fwd	AT3G48730	GAATCACACCTGACTTAACAATC	qPCR
	rev		GATGTCTCTTCTCCACCGT	qPCR
CHLH	fwd	AT5G13630	CTGGTCGTGACCCTAGAACAG	qPCR
	rev		GATTGCCAGCTTCTTCTCTG	qPCR
CHLD	fwd	AT1G08520	CCACATCAGATACGGATACGG	qPCR
	rev		GTCAGCATTGTACTCTATGCGCTC	qPCR
CHLI-1	fwd	AT4G18480	CGGTTATGAATGTAGCCACTG	qPCR
	rev		CTTGCCCTACTATAGCTGC	qPCR
CHLI-2	fwd	AT5G45930	CAGATCTCGTTACCATGTC	qPCR
	rev		GGCATAGCTTCATCTCATC	qPCR
GUN4	fwd	AT3G59400	CTCCATTGCCAATCTCAC	qPCR
	rev		CCGAATCTACCATCACTGTG	qPCR
CHLM	fwd	AT4G25080	TTGCTGAAGCTGAGATGAAGGCAAAG	qPCR
	rev		CAACGGTATCATACTTCCCAGTTAGG	qPCR
CHL27	fwd	AT3G56940	GCTTCTTCTGCCTCTCGGTTTATG	qPCR
	rev		GCCGTGGTTGCGTTTGTCTCG	qPCR
PORA	fwd	AT5G54190	TACCCTCTTCCCTCCTTTCC	qPCR
	rev		GTTCCAGCTCCAATACACTCC	qPCR
PORB	fwd	AT4G27440	TGATTACCCTTCAAAGCGTCTCA	qPCR
	rev		CAATGTATTCGTGTTCCCGGT	qPCR
PORC	fwd	AT1G03630	CTGGCAAAAGACTAGCACAGGTT	qPCR
	rev		CAATACACTCCTGACTTCCAAGAC	qPCR
CHLG	fwd	AT3G51820	TCATTCTCAGATTGTGTTCCA	qPCR
	rev		GTTACAAATATTCGAGCACCA	qPCR
DVR	fwd	AT5G18660	AGACTGGAGAGTATAGCGAGG	qPCR
	rev		GTTACCGAGTTCTTGACCC	qPCR
FC1	fwd	AT5G26030	AGCCGTTCCAGTCAGTTTCGT	qPCR
	rev		CTCCATGTCTATCTCTCAAGTGTCT	qPCR
FC2	fwd	AT2G30390	CCATACGTTGGTGCTATGGCT	qPCR
	rev		CGAGCGGAACCTAACGACTGTC	qPCR
<b>PHANGs</b>				
LHCB1.2	fwd	AT1G29910	GGACTTGCTTTACCCCGGTG	qPCR
	rev		TCGGTAGCAAGACCAATGG	qPCR
CA1	fwd	AT3G01500	TGTGTCCATCACACGTTCTGG	qPCR
	rev		GGACCAGGAAGGCATCTCCT	qPCR
RBCS	fwd	AT1G67090	GCAACGGCGGAAGAGTTAAC	qPCR
	rev		TCTTTCCAATCGGAGGCCA	qPCR
PC	fwd	AT1G76100	TGGTGTTGACGAAGACGAG	qPCR
	rev		AGATCTTGCTTGCGTCCACA	qPCR
CP12	fwd	AT3G62410	CGGACCTTTGGAGGAATACTG	qPCR
	rev		GGCACTCGTTGGTCTCAGGA	qPCR
<b>oxidativer Stress</b>				
sAPX	fwd	AT4G08390	GGGCACATAATTTACTCAACCA	qPCR
	rev		ATCCTTTGAACAGCCAGAAAC	qPCR
BAP1	fwd	AT3G61190	GTGGGATCGTCAATCTTTCTG	qPCR
	rev		GGCCACCGTATCCATCAATC	qPCR
<b>Anthocyanbiosynthese</b>				
PAL1	fwd	AT2G37040	GATTGGAGCTTTCGAGGAGG	qPCR

	rev		TTACCTTCACAAATCGCCGT	qPCR
<i>PAL2</i>	fwd	AT3G53260	CTACGTACCCGTTGATGCAG	qPCR
	rev		AGTTCCATTCCCATAAGCCG	qPCR
<i>PAL3</i>	fwd	AT5G04230	AGAAGTGGAAACGAGTCAGGA	qPCR
	rev		GAGTTCATTCCGCACAAACC	qPCR
<i>PAL4</i>	fwd	AT3G10340	AGAAGGCGGTTAAATCAGCA	qPCR
	rev		TGCATTAGCGGGTAAGTGAG	qPCR
<i>C4H</i>	fwd	AT2G30490	CGATATCCCAGCAGAAAGCA	qPCR
	rev		TTCGACGTCCAACACCAAAT	qPCR
<i>4CL1</i>	fwd	AT1G51680	AGACGGTTGGCTTCATACTG	qPCR
	rev		AGGATGACCGATGAGCAAAG	qPCR
<i>4CL2</i>	fwd	AT3G21240	AACTCAGTCCGAAGAACCAC	qPCR
	rev		GGCAAGACACAGAGGATCAC	qPCR
<i>CHS</i>	fwd	AT5G13930	GGTCTCACCTTCATCTCCT	qPCR
	rev		AGTATGAAGAGAACGCACGC	qPCR
<i>CHI</i>	fwd	AT3G55120	CATCGATCCTCTTCGCTCTC	qPCR
	rev		TTTGTCTCGATCACAGCGA	qPCR
<i>F3H</i>	fwd	AT3G51240	GGAACCATTACCTTGCTGCT	qPCR
	rev		CGAGTTAGAGTTCACCACGG	qPCR
<i>DFR</i>	fwd	AT5G42800	CGCCAAGACGCTACTCACT	qPCR
	rev		CGGCTTTATCACTTCGTTCTCA	qPCR
<i>F3'H</i>	fwd	AT5G07990	ACACCGATGGAGACTGTTGAGAA	qPCR
	rev		GCGTTAGCGTTCCAACCTCTTC	qPCR
<i>LDOX</i>	fwd	AT4G22880	GTGATTACATAGAAGCAACGAGTG	qPCR
	rev		CTAAACCTAGACCGACAGAGAGA	qPCR

#### Transkriptionsfaktoren der Anthocyanbiosynthese

<i>PFG1</i>	fwd	AT2G47460	TGTTGGACGAGTCAGATCCT	qPCR
	rev		AGTTGAGAAACGACTCCACC	qPCR
<i>TTG1</i>	fwd	AT5G24520	AGAGTCCTCAGCCTGATACG	qPCR
	rev		GCCTGTGTATCATCACCACC	qPCR
<i>TT8</i>	fwd	AT4G09820	AATGCTTGATGGTGTGGA	qPCR
	rev		CTTCGTAGGTGGAGTGTTCAGA	qPCR
<i>PAP1</i>	fwd	AT1G56650	GGCACCAAGTTCCTGTAAGAG	qPCR
	rev		CCTATGAAGGCGAAGAAGAAGA	qPCR

#### pku Mutanten

qRT_pku1_fwd	fwd		GCTTCTCTTCAATCATCTTCTC	qPCR
qRT_pku1_rev	rev		TTACTGTTCTGAATGGCTATCTG	qPCR
qRT_pku2_fwd	fwd		AGGGTCGGCTTCTCATAGT	qPCR
qRT_pku2_rev	rev		CTCCTTCACCGAGCTTGTT	qPCR
qRT_pku3_fwd	fwd		AGATTGGGCGATTCCGATG	qPCR
qRT_pku3_rev	rev		TAACATCATCCACCGTCGT	qPCR
qRT_pku5_fwd	fwd		ACGACAAGAACAACGAACCT	qPCR
qRT_pku5_rev	rev		GTAGCCCGAGCCAACAG	qPCR
qRT_pku12_fwd	fwd		GCTACAGCTCGTGGAAACA	qPCR
qRT_pku12_rev	rev		GCAGCATGTTCAAGTTTGG	qPCR

#### Klonierungen

##### GUN4-Konstrukte

AtGUN4 fwd -TP +BamHI	fwd	AT3G59400	GCGGGATCCATGGCGACCACAACTCTCTC	Rek. Express.
AtGUN4(WT) Rev +Sall	rev		CCAGTCGACTCAGAAGCTGTAATTTGTTTTAAACACT	Rek. Express.
AtGUN4(S264I) Rev +Sall	rev		CCAGTCGACTCAGAAGATGTAATTTGTTTTAAACACT	Rek. Express.
AtGUN4(S264D) Rev +Sall	rev		CCAGTCGACTCAGAAGCTGTAATTTGTTTTAAACACT	Rek. Express.
AtGUN4-3 Sall rev	rev		GTCGACTCAATTTGTTTTAAACACTCTTTT	Rek. Express.
AtGUN4-6 Sall rev	rev		GTCGACTCAAAACACTCTTTTGCTGCTCC	Rek. Express.
AtGUN4-9 Sall rev	rev		GTCGACTCATTTGCTGCTCTACTCCTGC	Rek. Express.
AtGUN4-12 Sall rev	rev		GTCGACTCATCCTACTCCTGCCTGTTCTT	Rek. Express.
CrGUN4_wo_TP_Bam_fwd	fwd	Cre05.g246800	GGATCC GCGATGCGCGTCACCGTCG	Rek. Express.
CrGUN4_wo_TP_Sal_rev	rev		GTCGACTTAGAACAGCGACTGTGTCCGCC	Rek. Express.
SynGUN4_BamHI_fwd	fwd		GGATCCATGTCTGATAATTTGACCGAA	Rek. Express.
SynGUN4_AtCterm_rev	rev		CATCAGCTGTGCGAAACGCTGGGTGCCTGTAAAGGGAT	Rek. Express.
SynGUN4_AtCterm_fwd	fwd		ATCCCTTTACAGGCACCCAGCGTTTGCGACAGCTGATG	Rek. Express.
CrGUN4_AtCterm_rev	rev		TCAGCTGTGCGAAACGCTGGGTGCTCCATGATCGC	Rek. Express.
CrGUN4_AtCterm_fwd	fwd		GCGATCATGGAGCACCAGCGTTTGCGACAGCTGA	Rek. Express.
AtGUN4Cterm_Sall_rev	rev		GTCGACTCAGAAGCTGTAATTTGTTTTA	Rek. Express.
At_GUN4(WT)_gDNA_SmaI_fwd	fwd	AT3G59400	CCCGGGCGAAGAATCACCACAATCTAC	Komp-Konstr.
At_GUN4(WT)_gDNA_PmlI_rev	rev		CACGTGCCTGTGACGGTTCCACACCA	Komp-Konstr.
At_GUN4(WT)_gDNA_Seq_fwd	fwd		GATCTTCAAGCTATCGACAATCT	Komp-Konstr.
At_GUN4(WT)_gDNA_Seq_rev	rev		AGATTGTCGATAGCTTGAAGATC	Komp-Konstr.
At_GUN4_gDNA_S264I_fwd	fwd		AAACAAATTACATCTCTGATGTCTTT	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_S264I_rev	rev		AAAGACATCAGAAGATGTAATTTGTTT	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_S264D_fwd	fwd		TAAACAAATTACGACTTCTGATGTCTTTC	SDM PCR



At_GUN4_gDNA_S264D_rev	rev		GAAAGACATCAGAAGTCGTAATTTGTTTTA	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_R115K_fwd	fwd		GAA GCC GCC GTG AAA AAG GGC TAC GTT TTC TTC TCC	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_R115K_rev	rev		GGA GAA GAA AAC GTA GCC CTT TTT CAC GGC GGC TTC	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_R115A_fwd	fwd		GAA GCC GCC GTG AAA GCT GGC TAC GTT TTC TTC TCC	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_R115A_rev	rev		GGA GAA GAA AAC GTA GCC AGC TTT CAC GGC GGC TTC	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_G116A_fwd	fwd		GCC GCC GTG AAA CGT GCG TAC GTT TTC TTC TCC GAG	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_G116A_rev	rev		CTC GGA GAA GAA AAC GTA CGC ACG TTT CAC GGC GGC	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_G116E_fwd	fwd		GCC GCC GTG AAA CGT GAG TAC GTT TTC TTC TCC GAG	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_G116E_rev	rev		CTC GGA GAA GAA AAC GTA CTC ACG TTT CAC GGC GGC	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_Y117S_fwd	fwd		GCC GTG AAA CGT GGC TCC GTT TTC TTC TCC GAG GTG	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_Y117S_rev	rev		CAC CTC GGA GAA GAA AAC GGA GCC ACG TTT CAC GGC	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_Y117F_fwd	fwd		GCC GTG AAA CGT GGC TTC GTT TTC TTC TCC GAG GTG	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_Y117F_rev	rev		CAC CTC GGA GAA GAA AAC GAA GCC ACG TTT CAC GGC	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_Y117A_fwd	fwd		GCC GTG AAA CGT GGC GGC GTT TTC TCC GAG GTG	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_Y117A_rev	rev		CAC CTC GGA GAA GAA AAC GGC GCC ACG TTT CAC GGC	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_V118A_fwd	fwd		GTG AAA CGT GGC TAC GCT TTC TTC TCC GAG GTG AAA	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_V118A_rev	rev		TTT CAC CTC GGA GAA GAA AGC GTA GCC ACG TTT CAC	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_V118D_fwd	fwd		GTG AAA CGT GGC TAC GAT TTC TTC TCC GAG GTG AAA	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_V118D_rev	rev		TTT CAC CTC GGA GAA GAA ATC GTA GCC ACG TTT CAC	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_F119W_fwd	fwd		AAA CGT GGC TAC GTT TGG TTC TCC GAG GTG AAA ACA	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_F119W_rev	rev		TGT TTT CAC CTC GGA GAA CCA AAC GTA GCC ACG TTT	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_F119Y_fwd	fwd		AAA CGT GGC TAC GTT TAC TTC TCC GAG GTG AAA ACA	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_F119Y_rev	rev		TGT TTT CAC CTC GGA GAA GTA AAC GTA GCC ACG TTT	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_F119A_fwd	fwd		AAA CGT GGC TAC GTT GCC TTC TCC GAG GTG AAA ACA	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_F119A_rev	rev		TGT TTT CAC CTC GGA GAA GGC AAC GTA GCC ACG TTT	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_F120W_fwd	fwd		CGT GGC TAC GTT TTC TGG TCC GAG GTG AAA ACA ATC	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_F120W_rev	rev		GAT TGT TTT CAC CTC GGA CCA GAA AAC GTA GCC ACG	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_F120Y_fwd	fwd		CGT GGC TAC GTT TTC TAC TCC GAG GTG AAA ACA ATC	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_F120Y_rev	rev		GAT TGT TTT CAC CTC GGA GTA GAA AAC GTA GCC ACG	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_F120A_fwd	fwd		CGT GGC TAC GTT TTC GCC TCC GAG GTG AAA ACA ATC	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_F120A_rev	rev		GAT TGT TTT CAC CTC GGA GGC GAA AAC GTA GCC ACG	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_S121Y_fwd	fwd		GGC TAC GTT TTC TTC TAC GAG GTG AAA ACA ATC TCC	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_S121Y_rev	rev		GGA GAT TGT TTT CAC CTC GTA GAA GAA AAC GTA GCC	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_S121A_fwd	fwd		GGC TAC GTT TTC TTC GCC GAG GTG AAA ACA ATC TCC	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_S121A_rev	rev		GGA GAT TGT TTT CAC CTC GGC GAA GAA AAC GTA GCC	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_E122D_fwd	fwd		TAC GTT TTC TTC TCC GAC GTG AAA ACA ATC TCC CCC	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_E122D_rev	rev		GGG GGA GAT TGT TTT CAC GTC GGA GAA GAA AAC GTA	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_E122A_fwd	fwd		TAC GTT TTC TTC TCC GCG GTG AAA ACA ATC TCC CCC	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_E122A_rev	rev		GGG GGA GAT TGT TTT CAC CGC GGA GAA GAA AAC GTA	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_V123A_fwd	fwd		GTT TTC TTC TCC GAG GCG AAA ACA ATC TCC CCC GAA	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_V123A_rev	rev		TTC GGG GGA GAT TGT TTT CGC CTC GGA GAA GAA AAC	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_V123E_fwd	fwd		GTT TTC TTC TCC GAG GAG AAA ACA ATC TCC CCC GAA	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_V123E_rev	rev		TTC GGG GGA GAT TGT TTT CTC CTC GGA GAA GAA AAC	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_K124R_fwd	fwd		TTC TTC TCC GAG GTG AGA ACA ATC TCC CCC GAA GAT	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_K124R_rev	rev		ATC TTC GGG GGA GAT TGT TCT CAC CTC GGA GAA GAA	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_K124A_fwd	fwd		TTC TTC TCC GAG GTG GCA ACA ATC TCC CCC GAA GAT	SDM PCR
At_GUN4_gDNA_K124A_rev	rev		ATC TTC GGG GGA GAT TGT TGC CAC CTC GGA GAA GAA	SDM PCR

**Proteinkinasen****rekombinante Expression**

PKU1_oTP_BamHI_fwd	fwd	AT5G61560	GGATCC GAGA TGCTTCTTCC AAGCA	Rek. Express.
PKU1_oTP_Sall_rev	rev		GTCGAC TTATTTAATTAGTTGTGATCTCCACTC	Rek. Express.
PKU1_Seq1_fwd	fwd		AGCCAGTAC ATAAAGACTT	Rek. Express.
PKU1_Seq2_fwd	fwd		TTCA GCACCTACT TTCTCCA	Rek. Express.
PKU2_oTP_BamHI_fwd	fwd	AT1G67520	GGATCC TGCAGTGAAA CAGATACGCT	Rek. Express.
PKU2_oTP_Sall_rev	rev		GTCGAC TTACAATGTGCCAGCAACTC	Rek. Express.
PKU2_Seq1_fwd	fwd		TTTGGGATGGATACTAATA	
PKU2_Seq2_fwd	fwd		ATTTTATAGCTTTGAAAGTG	Rek. Express.
PKU3_oTP_BamHI_fwd	fwd	AT3G51990	GGATCC GGAAGCCATGGAAGCG	Rek. Express.
PKU3_mTP_BamHI_fwd (new)	fwd		GGATCC CGTCTAGACTTCGTCGTTT	Rek. Express.
PKU3_oTP_KpnI_rev	rev		GGTACC TCATTCCACGGGTCGAC	Rek. Express.
PKU3_Seq1_fwd	fwd		AATGTTGATGATCAAAAAG	Rek. Express.
PKU5_oTP_KpnI_fwd	fwd	AT3G61080	GGTACC GCTATGGCTGCAATGAGT	Rek. Express.
PKU5_oTP_Sall_rev	rev		GTCGACTTAAGCTTTGAGCATCCGTA	Rek. Express.
PKU5_Seq1_fwd	fwd		GATTGAATTTTATGGTGAG	Rek. Express.
PKU12_oTP_BamHI_fwd	fwd	AT5G05200	GGATCC GCCCAGTA TTCGCAAACT	Rek. Express.
PKU12_oTP_Sall_rev	rev		GTCGAC TTAGTTGAAGCTGTCCTTGATATC	Rek. Express.
PKU12_Seq1_fwd	fwd		ATTGAAAGTGATACG AA	Rek. Express.
PKU12_Seq2_fwd	fwd		TTTCTTGATTTTGGCA	Rek. Express.
PKU13_fwd_BamHI	fwd	AT3G18680	GGATCTCCAA CCAGAATTACAGTAGGC	Rek. Express.
PKU13_rev_Sall	rev		GTCGACTCATGAGGTTGTTGTAACAATG	Rek. Express.
PKU13_seq_fwd	fwd		CGCTCTCTGCTGATTATAT	Rek. Express.

**Lokalisierung**

PKU1_Xmal-f	rev	AT5G61560	CCCGGGATGGGAGACGGAGCTTTAAT
PKU1_Xmal-oSTOP-r	fwd		CCCGGGTTTAATTAGTTGTGATCTCCA
PKU2_Xmal-f	rev	AT1G67520	CCCGGGATGTGTTCAAATGGCATCTTT
PKU2_Xmal-oSTOP-r	fwd		CCCGGGCAATGTGCCAGCAACTCTTTTG
PKU3_Xmal-f	rev	AT3G51990	CCCGGGATGGGTTATCTCTCCTGCAA
PKU3_Xmal-oSTOP-r	fwd		CCCGGGTTCACGGGTCGACCAC
PKU5_Xmal-f	rev	AT3G61080	CCCGGGATGGCGGTGGCTTCTCTTAG
PKU5_Xmal-oSTOP-r	fwd		CCCGGGAGCTTTGAGCATCCGTAG
PK7_Xmal-f	rev	AT2G39190	CCCGGGATGGCGTCCGTATCTCCATC
PK7_Xmal-oSTOP-r	fwd		CCCGGGGTACGAAGTGCGACTGGAGCA
PK10_Xmal_fwd_n	rev	AT1G18160	GGTACCACAATGAAGATGAACATGAAGAAATTTCTCA
PK10_Xmal_rev_n	fwd		GGTACCTTGTTCTGCTCATCAGTG
PK11_Xmal_fwd_n	rev	AT3G57770	CCCGGGACAATGGCCACATATCAGATATTAAAC
PK11_Xmal_rev_n	fwd		CCCGGGTGTTATAACTGTCACCATTAGCC
PKU12_Xmal_fwd_n	rev	AT5G05200	CCCGGGACAATGGCGGTCTCAGCTTT
PKU12_Xmal_rev_n	fwd		CCCGGGGTTGAAGCTGCTCTTGATCC
PKU13_Xmal-f	rev	AT3G18680	CCCGGG ATGGCAATTC CGTTGCCTCT
PKU13_Xmal-oSTOP-r	fwd		CCCGGGTGAGGTTGTTGTAACAATGGA

#### Genotypisierung

AtGUN4_5'UTR850_fwd	fwd	AT3G59400	AACACGCCTTAATCAATCTG	Genotypisierung
AtGUN4_3'UTR650_rev	rev		TCGTCAGTATCCAGGCGCGT	von <i>gun4-2</i>
Tnos_Seq_rev	rev	Nos-terminator	ATATGATAATCATCGCAAGACCGG	Komplementati
pROK2-south rev	rev	SALK T-DNA LB	AACAGCTGATTGCCCTTCAC	onlinien
LBb1.3	rev	SALK T-DNA LB	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	Genotypisierung
GK_LB_o8409	rev	GABIKAT LB	ATATTGACCATCATACTCATTGC	Genotypisierung
GK_LB_o8474	rev	GABIKAT LB	ATAATAACGCTGCGGACATCTACATTT	Genotypisierung
pDsLoxHs_LB	rev	WisDsLoxHS LB	TGATCCATGTAGATTTCCCGGACATGAAG	Genotypisierung
pDSLox_LB	rev	WisDsLox LB	AACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC	Genotypisierung
Ds3-2 (LB)	rev	CSHL LB	CGATTACCGTATTTATCCCGTTC	Genotypisierung
Tag5 (LB)	rev	FLAG LB	CTACAAATTGCCTTTTCTTATCGAC	Genotypisierung
pku1-2_LP	LP	CSHL_GT8369	GATGGGCACTTCAAGAATTTG	Genotypisierung
pku1-2_RP	RP		TGACGGAGTTCAATCTTCAGC	Genotypisierung
pku1-3_LP	LP	CSHL_GT18334	AACAGAACAATGAACCGCATC	Genotypisierung
pku1-3_RP	RP		AGTGTGGATGACGAATCTTGC	Genotypisierung
pku2-1_LP	LP	SALK_004748C	CAAGGCATTTTGCCTAGAGAG	Genotypisierung
pku2-1_RP	RP		CTTGATAGCCACTTCTTCCCC	Genotypisierung
pku2-2_LP	LP	SALK_070579C	TTCGAAGGTCAACAATTCCAC	Genotypisierung
pku2-2_RP	RP		CAAGAGAATCCACTGTGAGGC	Genotypisierung
pku2-3_LP	LP	WiscDsLox497_10B	TCGATGCAACATCCTAAAACC	Genotypisierung
pku2-3_RP	RP		TGTCTTGCCTATGCTTCAACC	Genotypisierung
pku3-6_LP	LP	SALK_030551	GAAAATGAATGACAGCATTTTG	Genotypisierung
pku3-6_RP	RP		CAAAATCGCTCTTCAGATTGC	Genotypisierung
pku5-5_LP	LP	GABI_684D04	TGGAAATGATCATCACTGACG	Genotypisierung
pku5-5_RP	RP		ACACTATTGGCAGGTGGAATG	Genotypisierung
pku12-1_LP	LP	SALK_201431	GAATTCATCATCGTTCTTGGC	Genotypisierung
pku12-1_RP	RP		CAGGAAACTTATGGCTGTTGC	Genotypisierung
pku12-2_LP	LP	FLAG_243F12	ATATCTCAACCAATTTGGGC	Genotypisierung
pku12-2_RP	RP		AAACCCAGATGGAAAGAGAGC	Genotypisierung

## Anhang II – HPLC Methoden

**Analyt:** Violaxanthin, Neoxanthin, Antheraxanthin, Lutein, Zeaxanthin, Chlorophyll a, Chlorophyll b, beta-carotin

**name of method:** Pigmente 4A **HPLC: 4**

**standard:** 10 pmol

**column:** Prontosil C30 250x4,6 mm 3µm

**detector and wavelength:** DAD 440 nm

**mobile phase:**

**A** 90% acetonitrile (ACN) 10% H<sub>2</sub>O 0,1% Triethylamin  
**B** 100% ethylacetat  
**C**  
**D**

**thermostated column**

**comp. :** 35°C

**flow rate:** 1ml/ min

**length of method:** 28 min

**injektion:** 1 - 90 µl

**run timetable:**

<u>time/min</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
0	100	0
1	70	30
23	0	100
24	0	100
24.1 - 28	100	0

**Analyt:** Protoporphyrin IX

**method:** Proto IX\_06B **HPLC: 3**

**standard:** 1 pmol

**column:** Agilent poroshell 120 - C18

**detector and wavelength:** FLD Ex. 405 nm Em. 637 nm

**mobile phase:**

**A**  
**B** 10% 1M ammoniumacetat pH 5.2 90% methanol  
**C**  
**D** 100% ethylacetat

**thermostated column comp.:** 20°C

**flow rate:** 0.5ml/min

**length of method:** 12 min

**injection:** 1 - 20µl

<b>run timetable:</b>	<u><b>time/min</b></u>	<u><b>%B</b></u>	<u><b>%D</b></u>
	4	90	10
	4.1	100	0
	8	100	0
	8.1 - 12	90	10

Analyt:	Mg-Protoporphyrin IX Mg-Protoporphyrin IX momomethylester		
method:	porph02B		HPLC: 3
standard:	1 pmol	both	
column:	Agilent-Poroshell 120-C18		
detector and wavelength:	FLD	Ex. 420 nm	Em. 600 nm
mobile phase:	A B 10% 1M ammoniumacetat pH 5.2 90% methanol C D 100% ethylacetat		
thermostated column comp.:	20°C		
flow rate:	0.450 ml/min		
length of method:	17 min		
injection:	1 - 20µl		
run timetable:	<u>time/min</u>	<u>%B</u>	<u>%D</u>
	5	100	0
	5.1	70	30
	9	70	30
	9.1 - 17	100	0

**Analyt:** Chlorophyllid  
Protochlorophyllid

**method:** Pchlde\_HPLC3 auf HPLC:  
3  
Pchlde2016 auf HPLC:  
5

**standard:** 10 pmol

**column:** Waters Nova Pak C18 3,9x150mm

**detector and wavelength:** DAD 430  
**Chlide:** nm  
**Pchlde:** FLD Ex. 435 nm Em. 644 nm

**mobile phase:**  
**A** 20% 1M Ammoniumacetat pH 7,0 + 80% Methanol  
**B** 100 % Methanol  
**C**  
**D**

**thermostated column  
comp.:** 20°C

**flow rate:** 1ml/min

**length of method:** 18 min

**injection:** 1 bis 20µl

<b>run timetable:</b>	<b><u>time / min</u></b>	<b><u>% A</u></b>	<b><u>% B</u></b>
	0	100	0
	5	50	50
	7	0	100
	12	0	100
	13.1 - 18	100	0

**Analyt:** heme

**method:** H3A1\_B **HPLC: 5**

**standard:** 10 pmol

**column:** Poroshell 120 EC C18  
2,7µm

**detector and wavelength:** DAD 398 nm

**mobile phase:**

**A1** Wasser pH 3,2 (with acetic acid)  
**B1** 100% Methanol  
**C**  
**D**

**thermostated column compartment:** 30°C

**flow rate:** 0.8 ml/min

**length of method:** 11 min

**injection:** 1 - 20 µl

<b>run timetable:</b>	<b><u>time/min</u></b>	<b><u>A1</u></b>	<b><u>B1</u></b>
	4	30	70
	4.1	0	100
	8	0	100
	8.1 - 11	30	70





## Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei meinen Kolleg\_innen und Freund\_innen für die mir zuteil gewordene Unterstützung bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit danken. Wenngleich nicht namentlich erwähnt, hat jede\_r einzelne auf seine besondere Art zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Danke dafür!

Für die inzwischen langjährige und erfolgreiche Kooperation im Rahmen der Charakterisierung von Proteinkinasen und massenspektrometrischen Analysen, danke ich Anna Schönberg und Dr. Anja Rödiger aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sacha Baginsky aus Halle. Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. Christian Fufezan aus Münster für seinen Einsatz im Rahmen des GUN4-Projektes bedanken.

Mein individueller Dank gilt den Studierenden, die mich während der Erstellung meiner Arbeit im Rahmen von Projektmodulen und Abschlussarbeiten begleitet haben. Nur durch ihren Einsatz war es mir möglich, vielzählige Ideen und experimentelle Ansätze zu verfolgen. Joram Schimmeyer und Laura Heinze danke ich für ihre Mithilfe bei der Entwicklung des Kinaseassay für rekombinante Proteine. Für ihre Mitarbeit an den Experimenten zur rekombinanten Mg-Chelatase und Charakterisierung der Eigenschaften von GUN4 sei Andreas Heimann, Franziska Kuhnert, Caroline Hochheuser und Alexandra Kwast gedankt. Mona Fechner, Hans Gartmann und Patrick Schall möchte ich für die Unterstützung im Projekt zur Identifizierung plastidärer Proteinkinasen und ihrer Zielproteine danken.

Für seine unermüdliche Bereitschaft zur fachlichen Unterstützung, Diskussion von Ideen und Ergebnissen, sowie die Möglichkeit die experimentellen Arbeiten in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu dürfen, sei ein besonderer Dank an Prof. Dr. Bernhard Grimm gerichtet.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie - Tina und Lasse - für ihre Unterstützung und die mit mir geteilte Liebe danken.



## Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze keinen entsprechenden Doktorgrad. Ich erkläre, dass ich die Dissertation oder Teile davon nicht bereits bei einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung eingereicht habe und dass sie dort weder angenommen noch abgelehnt wurde. Ich erkläre die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung der Lebenswissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin vom 5. März 2015. Weiterhin erkläre ich, dass keine Zusammenarbeit mit gewerblichen Promotionsberaterinnen/Promotionsberatern stattgefunden hat und dass die Grundsätze der Humboldt-Universität zu Berlin zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis eingehalten wurden.

Andreas Richter

Berlin,

